



EESTI MAAÜLIKOOL
Põllumajandus- ja keskkonnainstituut

Meelis Kõiv

**FUNGITSIIDIDEGA TÖÖTLEMISE MÕJU MÜKOTOKSIINE
TOOTVATE *FUSARIUM* PEREKONNA SEENELIIKIDE
ESINEMISELE ROHUSILO TOOTMISEKS KASVATATAVAS
HEINTAIMIKUS**

THE EFFECTS OF FUNGICIDE APPLICATIONS ON
MYCOTOXIN PRODUCING *FUSARIUM* SPECIES IN GRASS
SILAGE

Bakalaureusetöö
Aianduse õppekava

Juhendajad: Britt Puidet, *MSc*
Kaire Loit, *MSc*

Tartu 2021

Eesti Maaülikool		Bakalaureusetöö lühikokkuvõte	
Kreutzwaldi 1, Tartu 51014			
Autor: Meelis Kõiv		Õppekava: Aiandus	
Pealkiri: Fungitsiididega töötlemise mõju mükotoksiine tootvate <i>Fusarium</i> perekonna seeneliikide esinemisele rohusilo tootmiseks kasvatatavas heintaimikus			
Lehekülgi: 53	Jooniseid: 7	Tabeleid: 1	Lisasid: 5
Osakond: Taimetervise õppetool			
Uurimisvaldkond: B390 Taimekasvatus, aiandus, taimekaitsevahendid, taimehaigused			
Juhendajad: Britt Puidet, Kaire Loit			
Kaitsmiskoht ja aasta: Tartu, 2021			
<p>Loomakasvatuse intensiivistumisega suureneb järjest enam nõudlus kvaliteetse loomasööda järgi. Rohusilo on paljudes Euroopa riikides põhisööt, mida loomadele antakse. Viimase aja uuringud aga viitavad sagedasele mükotoksiinidega saastatusele silodes, mis võib põhjustada loomadele terviseprobleeme. Enamik mükotoksiine produtseerivatest seeneliikidest kuulub perekonda <i>Fusarium</i>, mille esindajad on ka laialt levinud haigustekitajad paljudel kultuurtaimedel.</p> <p>Antud bakalauerusetöö eesmärkideks oli välja selgitada Eesti heintaimedel levivad mükotoksiine tootvad <i>Fusarium</i> perekonna liigid ja uurida fungitsiididega töötlemise mõju nende esinemisele. Katsete läbiviimiseks rajati Aatma OÜ kultuurrohumaaale neli katselappi, mida töödeldi Mirador 250 SC-ga, Juventus 90[®]-ga ja mõlema fungitsiidi seguga. Rohuproove koguti katselappidelt enne ja pärast fungitsiididega töötlemist. <i>Fusarium</i> perekonna liikide määramiseks ja fungitsiidide mõju hindamiseks kasutati PCR-i põhiseid meetodeid.</p> <p>Mükotoksiine tootvate <i>Fusarium</i> perekonna liikide määramiseks testiti antud töös mitmeid erinevaid liigispetsiifilisi praimereid, millega tuvastati rohuproovidest <i>F. culmorum</i>, <i>F. cerealis</i> ja <i>F. poae</i>. Kõik kindlaksmääratud liigid on suutelised tootma erinevaid mükotoksiine ja seeläbi potentsiaalselt saastama ka rohusilo. Töös esitatud andmete põhjal ei saa hetkel kinnitada, et ükski fungitsiid vähendaks <i>Fusarium</i> perekonna liikide esinemist rohttaimedes. Täpsemate järelduste tegemiseks tuleks läbi viia korduskatseid suurema valimiga ja kasutama konventsionaalse PCR-i kõrval ka qPCR-i ning kombineerima neid keemiliste analüüsidega.</p>			
Märksõnad: metkonasool, asoksüstrobiin, seenpatogeenid, PCR, rohumaad			

Estonian University of Life Sciences Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Abstract of Bachelor’s Thesis	
Author: Meelis Kõiv		Curriculum: Horticulture	
Title: The effects of fungicide applications on mycotoxin producing <i>Fusarium</i> species in grass silage			
Pages: 53	Figures: 7	Tables: 1	Appendixes: 5
Department: Chair of Plant Health Field of research: B390 Phytotechny, horticulture, crop protection, phytopathology Supervisors: Britt Puidet, Kaire Loit Place and date: Tartu, 2021			
<p>Due to the intensification of livestock production, demand for high-quality animal feed is also increasing. Ensiled forages like grass silages are important components of animal diets in many European countries. However, recent studies show that forages can often be contaminated with different mycotoxins, which can adversely affect animal health. The genus <i>Fusarium</i> is one of the most important mycotoxin-producing fungal groups that can affect a wide range of crops across the world.</p> <p>The aims of this study were to identify which mycotoxin-producing <i>Fusarium</i> species are present in grassland plants in Estonia and to analyze the effects of fungicide applications on their presence. To conduct the research, four test plots were selected from the grassland of Aatma OÜ. Each of the plot were either treated with Mirador 250 SC, Juventus 90® or a mixture of both fungicides. Grass samples were collected before and after fungicide application. PCR-based methods were used to identify different <i>Fusarium</i> species and to evaluate the effects of fungicides.</p> <p>Numerous different species-specific primers were tested in this study. Three <i>Fusarium</i> species were detected from the grass samples: <i>F. culmorum</i>, <i>F. cerealis</i> and <i>F. poae</i>. All identified species are capable of producing different mycotoxins and therefore potentially contaminate grass silage with mycotoxins. The results presented in this study do not confirm that fungicides reduce the presence of <i>Fusarium</i> species in grassland plants. For more accurate conclusions, a larger sample size, qPCR in addition to conventional PCR and chemical analyzes should be used.</p>			
Keywords: metconazole, azoxystrobin, pathogenic fungi, PCR, grasslands			

SISUKORD

SISSEJUHATUS	6
1. ROHUMAAD.....	8
1.1. Rohusilo.....	9
1.2. Heintaimede haigused ja nende tõrje.....	10
2. PEREKOND <i>FUSARIUM</i>	12
2.1. <i>Fusarium</i> liikide poolt produtseeritavad mükotoksiinid	13
2.1.1. Mükotoksiinide esinemine silos	14
2.2. <i>Fusarium</i> perekonna süstemaatika	16
2.2.1. <i>Fusarium</i> liigid	16
2.3. <i>Fusarium</i> liikide poolt põhjustatud heintaimede haigused.....	18
2.3.1. Lumiseen	18
2.3.2. Kõrreliste juurekaelamädanik ja fusarioos	18
2.3.3. Liblikõieliste juure- ja juurekaelamädanik	19
3. FUNGITSIIDID	20
3.1. Metkonasool	20
3.2. Asoksüstrobiin.....	21
4. MATERJAL JA METOODIKA.....	22
4.1. Katseala iseloomustus ja fungitsiididega töötlemine.....	22
4.2. Proovide kogumine.....	23
4.3. <i>Fusarium</i> liikide molekulaarne määramine	24
4.3.1. DNA eraldamine rohuproovidest.....	24
4.3.2. PCR <i>Fusarium</i> perekonnaspetsiifiliste praimeritega.....	24
4.3.3. PCR <i>Fusarium</i> liigispetsiifiliste praimeritega	25
5. TULEMUSED.....	28
5.1. <i>Fusarium</i> perekonnaspetsiifiliste praimerite PCR-i tulemused.....	28
5.2. Liigispetsiifiliste praimerite PCR-i tulemused	29
6. ARUTELU JA JÄRELDUSED.....	34
KOKKUVÕTE	37
KASUTATUD KIRJANDUS	38
LISAD	47

Lisa 1. Juventus® 90 kasutamise eriluba	48
Lisa 2. Mirador 250 SC kasutamise eriluba	49
Lisa 3. Uurimistöös katsetatud liigispetsiifilised praimerid	50
Lisa 4. Rohuproovide PCR analüüside positiivsed ja negatiivsed tulemused.....	52
Lisa 5. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendajate kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta	53

SISSEJUHATUS

Perekonna *Fusarium* seeneliigid on laialt levinud taimepatogeenid, mis võivad paljudel kultuurtaimedel põhjustada ulatuslikku saagikadu ning saastada neid mükotoksiinidega (Munkvold 2017). Lisaks suurele majanduslikule kahjule on *Fusarium* liikide poolt toodetud mükotoksiinid kahjulikud nii loomadele kui ka inimestele (Ogunade *et al.* 2018). Mükotoksiine leidub sageli teraviljades, köögi- ja puuviljades, pähklites, kohvi- ja kakaoubades, õlus ja veinis (Ferrão *et al.* 2017). Kui kariloomad tarbivad mükotoksiinidega saastunud sööta võivad toksiinid potentsiaalselt edasi kanduda ka liha- ja piimatoodetesse (Becker-Algeri *et al.* 2016; McElhinney *et al.* 2016).

Paljud uuringud viitavad mükotoksiinide laialdasele esinemisele erinevates loomasöötades (Driehuis *et al.* 2008; Ogunade *et al.* 2018; Panasiuk *et al.* 2019; Storm *et al.* 2008). Gruber-Dorninger *et al.* (2019) poolt läbi viidud ülemaailmses uuringus leiti, et 88% kogutud loomasööda proovides leidis vähemalt üks mükotoksiin. Loomasöötades on enamlevinud *Fusarium* seente poolt produtseeritud mükotoksiinideks desoksünivalenool (DON) ja zearalenoon (ZEA) (Driehuis *et al.* 2008; Whitlow & Hagler 2005). Silo on üks põhilisi loomasöötasid, moodustades mäletsejate söödaratsioonis sageli 50-70% kogu söödast (Cogan *et al.* 2017; Dunière *et al.* 2013). Vaatamata silo suurele osakaalule loomade söödaratsioonis on mükotoksiinide sisaldust ja *Fusarium* liikide esinemist heintaimedes ning sellest toodetud silos võrreldes teraviljade või teiste loomasöötadega väga vähe uuritud (Ogunade *et al.* 2018; Panasiuk *et al.* 2019).

Eestis on heintaimedes leiduvaid patogeenseid seeni vähe uuritud, viimased andmed pärinevad eelmise sajandi lõpust. Sõmermaa (1995) hinnangul võivad pooled teadaolevad teravilju kahjustavad seeneliigid esineda ka heintaimedel. *Fusarium* perekonna seeneliike ja nende esinemist on Eestis uuritud põhjalikumalt teraviljades (Lõiveke 2008). Antud töös kasutati *Fusarium* perekonna liikide määramiseks molekulaarseid meetodeid, mida peetakse traditsiooniliste kultuuripõhiste meetodite kõrval täpsemaks ja kiiremaks (Gaviria-Rivera *et al.* 2018).

Tootmiseks mõeldud rohumaadel pole fungitsiidide kasutamine Eestis lubatud, mille tõttu on senine haiguste tõrje piirdunud muude agrotehniliste võtetega (Bender 2006a). Mükotoksiinide vähendamiseks silos on kasutusel ka erinevad söödalisandid ja toksiinide sidujad, kuid nende efektiivsust ei ole veel palju uuritud (Ogunade *et al.* 2018). Uurimistöö katse jaoks valiti fungitsiidideks Juventus® 90 ja Mirador 250 SC, mida kasutatakse sageli *Fusarium* perekonna liikide tõrjeks teraviljadel.

Antud uurimistöö eesmärkideks oli välja selgitada molekulaarsete meetodite abil Eesti heintaimedel esinevad mükotoksiine tootvad *Fusarium* perekonna liigid ning uurida valitud fungitsiididega töötlemise mõju nende esinemisele. Eesmärkidest lähtuvalt seati uurimistöö hüpoteesiks, et fungitsiididega töötlemine vähendab *Fusarium* liikide esinemist heintaimikus.

Käesolev töö valmis Põllumajanduse Registrite ja Informatsiooni Ameti poolt rahastatud projekti L200018VLST raames. Töö autor soovib tänada oma juhendajaid Britt Puidetit ja Kaire Loiti ning lisaks ka Liina Soonvaldi, Rita Kreevanit ja Rein Lillakut, kes aitasid kaasa töö valmimisele.

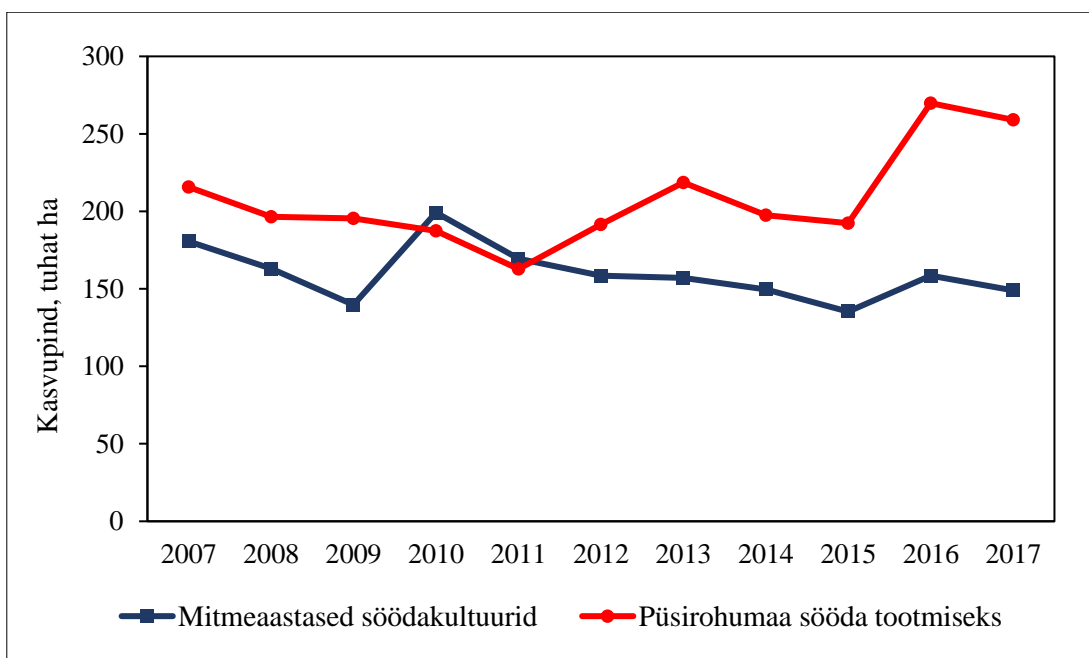
1. ROHUMAAD

Rohumaa on ala, mida iseloomustab puittaimede puuduse tõttu avatus, ning kus domineerivad eelkõige mitmeaastased kõrreliste (*Poaceae*) ja liblikõieliste (*Fabaceae*) sugukonda kuuluvad rohttaimed (Gibson 2009). Rohumaad on ühed olulisemad ökosüsteemid maailmas ning nende panus inimeste heaolusse on märkimisväärne. Ökosüsteemiteenuseid ja hüvesid, mida rohumaad pakuvad on hulgaliselt: sööt kari- ja metsloomadele, bioloogilise mitmekesisuse säilitamine, mullatervise parandamine, kaitse leostumise ja erosiooni eest, süsiniku sidumine, bioenergia, elupaik loomadele jm (Carlier *et al.* 2009; Grinienė *et al.* 2019). Ligikaudu 40,5% kogu maismaa pinnast on kaetud rohumaadega, moodustades kokku umbes 54,5 miljonit km² (White *et al.* 2000). Rohumaad on esindatud igal mandril välja arvatud Antarktikas (*Ibid.*).

Rohumaade klassifitseerimine on keeruline, kuna rühmitamise aluseks võetavaid tegureid on mitmeid ning universaalne süsteem puudub. Inimmõjust lähtuvalt liigitatakse rohumaad kolme suurrühma: looduslikud rohumaad, poollooduslikud rohumaad ehk pärandkooslused ja kultuurrohumaad (Bender 2006b). Kultuurrohumaad on uuskülvi või pealtparandamise teel rajatud rohumaad, mille põhieesmärgiks on anda kvaliteetset ja hea toiteväärtusega loomasööta (Adojaan 1961). Kasutusviisi alusel jaotatakse rohumaad karjamaadeks, niitudeks või universaalseteks rohumadeks (Bender 2006b). Põllumajanduslikus kontekstis saab kultuurrohumaid omakorda jaotada veel kestuse, liigilise koosseisu, rajamisviisi ja kasvukoha alusel.

Eesti rohumaa pindalast puudub täpne ülevaade. Lisaks puudulikele andmetele on statistika tegemine raskendatud uute vastuoluliste mõistete tõttu. Alates 2003. aastast loetakse looduslike rohumaa alla ka üle viie aasta vanuseid kultuurrohumaaasid, mis varasema klassifikatsiooni järgi oleksid pikaajalised rohumaad (PM028 2018). Lisaks on võetud kasutusele mõiste püsirohumaa, mille alla kuuluvad samuti rohumaad, kus heintaimede segu on kasvanud vähemalt viis või enam aastat (PRIA 2021).

Eesti Statistikaameti andmetel on sööta tootvate püsirohumaade pind alates 2015. aastast suurenenud, ulatudes 2016. aastal 270 tuhande hektarini (joonis 1). Mitmeaastaste söödakultuuride kasvupind on kümne aasta vältel püsinud aga suhteliselt stabiilsena vahemikus 140-200 tuhat hektarit. Maa-ameti andmetel on 2019. aasta seisuga looduslike rohumaade pindala Eestis 240 641 hektarit (Haritava maa... 2019).



Joonis 1. Mitmeaastaste söödakultuuride ja sööta tootvate püsirohumaade kasvupind Eestis aastatel 2007-2017 (PM03 2018).

1.1. Rohusilo

Loomasööda pikaajalisemaks säilitamiseks kasutatakse erinevaid konserveerimisviise. Põhilisteks meetoditeks on haljasmassi kuivatamine looduslikult heinaks või haljasmassist silo valmistamine (Older 2011). Konserveerimisviis sõltub valdavalt kliimast ja asukohast, soojemates riikides nagu Põhja-Ameerika ja Austraalia säilitatakse sööt suuremalt jaolt heinana, jahedama ning niiskema kliimaga kohtades aga silona (Alonso *et al.* 2013).

Silo on mahlakas sööt, mida toodetakse taimsest materjalist kontrollitud käärimistingimustes (Bender 2006b). Sileerimise läbi on võimalik sööta säilitada pikaajaliselt ning hästi sileeritud söödas püsib alles taimede toiteväärtus ja kvaliteet (Alonso *et al.* 2013). Silo valmistatakse põhiliselt heintaimedest või maisist, vähemlevinumad on teraviljad, juur- ja kaunviljad (Wilkinson, Toivonen 2003). Rohusilo tootmine on rohkem levinud Euroopas, eelkõige jahedama kliimaga riikides ja maisisilo eelkõige Põhja-Ameerikas. Tänu uutele maisisortidele on ka Euroopas maisisilo tootmine viimase paarikümne aastaga siiski jõudsalt kasvanud (Storm *et al.* 2008; Wilkinson, Toivonen 2003). Kuigi silo tegemise põhimõtted on selged olnud aastasadu, hakati seda konserveerimisviisi laialdaselt kasutama alles alates 1950. aastast (Wilkinson, Toivonen 2003). Sileerimise kasutuselevõtt oli tingitud loomakasvatuse intensiivistumisest ja söödakoristuse mehhaniseerimisest (*Ibid.*).

Kõige tähtsamad faktorid silo valmistamise juures on kiire anaeroobse keskkonna tekitamine ja haljasmassi piimhappeline käärimine (Bender 2006b). Käärimise tagajärjel alaneb silo pH, mille tõttu vabanevad taimerakkudest toitained ning hävineb enamik kahjulikest mikroorganismidest (Older 2011). Piimhappeline käärimine toimub tänu taimede mikroflooras elavatele piimhappebakteritele, kuid käärimise soodustamiseks kasutatakse sageli ka erinevaid keemilisi ja bioloogilisi silokindlustuslisandeid (Rodríguez-Blanco *et al.* 2021).

Käärimisprotsessi suunamiseks on soovitatav silo teha eelkuivatatud ehk närvutatud rohust (Bender 2006b). Närvutamise tõttu tõuseb rohu kuivainesisaldus, mis omakorda parandab rohu käärimistingimusi, vähendab mahlakadu ja suurendab silokindlustuslisandite toimet (Bender 2006b; Lättemäe *et al.* 2000). Rohtu on võimalik peale niitmist hea ilmaga otse põllul närvutada (Bender 2006b). Sileeritava materjali optimaalseks kuivainesisalduseks peetakse 30-45%, liiga kõrge kuivainesisalduse juures lakkab käärimisprotsess (*Ibid.*).

1.2. Heintaimede haigused ja nende tõrje

Eestis tekitavad kõige suuremat kahju heintaimedele erinevad seenhaigused, ületades mitmekordselt putukate ja teiste organismide poolt tekitatud kahju (Bender 2006a).

Seenhaiguste põhjustatud kahju ei seisne üksnes saagikadudes, vaid ka heintaimiku kvalitatiivsetes muutustes. Seenhaiguste tagajärjel võib taimedes proteiini sisaldus väheneda, halveneda seeduvus ning mükotoksiinidega saastatuse tõttu võib sööt kariloomadele mürgistusi põhjustada (Bender 2006a; Skladanka *et al.* 2013).

Heintaimedel esinevate seente uurimine Eestis on jäänud valdavalt eelmisesse sajandisse, mistõttu puuduvad tänapäevased andmed nende leviku ja arvukuse kohta. Milvaste (1999) andmetel on Eestis leitud kõrrelistelt taimedelt kokku 427 mikroseent, millest valdav osa on taimedele ohutud saproobse eluvormiga seened. Olulisemad kõrreliste heintaimede haigustekitajad on poolparasiitsed ja täisparasiitsed seened, mida leidub Eestis paarkümmend liiki (Bender 2006a). Nendest on laialt levinud näiteks pruunlaiksuse, lumiseene, juuremädanike, musttäptõve, erinevate roostete ja jahukaste haigustekitajad (*Ibid.*). Üle poolte teadaolevatest teravilju kahjustatavatest liikidest võivad esineda ka kõrrelistel heintaimedel (Sõmermaa 1995). Liblikõieliste heintaimede seenhaigustest on levinud Eestis näiteks lehevarisemistõbi, juuremädanikud, jahukaste, ebajahukaste, varrepõletik ja erinevad roosted (Bender 2006a). *Fusarium* perekonna liigid põhjustavad heintaimedel erinevaid juure- ja juurekaela haiguseid, kõrrelistel lisaks veel fusarioose ning lumiseent (Lõiveke 1995).

Eestis on rohumaadel levivate haiguste tõrjeks kasutusel valdavalt profülaktilised ja agrotehnilised võtted, keemilist haiguste tõrjet on lubatud teha ainult seemnepõldudel (Bender 2006a). Seenhaiguste leviku vähendamiseks on soovitatav järgida viljavaheldusnõudeid, taimi optimaalselt väetada, valida kasvukohale sobivad sordid, külvata optimaalsel ajal ja võimalusel puhtida seemneid (Loid 1987). Tähtsal kohal on ka õigeaegne niitmine, mis vähendab seenhaiguste levimist ja mükotoksiinide taset taimedes (Bender 2006a; Ogunade *et al.* 2018).

2. PEREKOND *FUSARIUM*

Perekond *Fusarium* Link. Ex Fr. kuulub kottseente (*Ascomycota*) hõimkonda ja komuseeneliste (*Nectriaceae*) sugukonda (O'Donnell *et al.* 2015). Antud perekonda peetakse väga tähtsaks taimepatogeenide rühmaks maailmas, põhjustades haiguseid peaaegu kõikidele majanduslikult tähtsatele põllu- ja aianduskultuuridele (Summerell 2019). *Fusarium* liikide poolt põhjustatud haiguste hulgas on mitmed juurehaigused, tõusmepõletikud ja erinevad lehe-, vilja- ning talvitumishaigused (Leslie, Summerell 2006; Lõiveke 2008). Lisaks haigustele on paljud *Fusarium* liigid võimelised produtseerima kahjulikke mükotoksiine (Lõiveke 2008; O'Donnell *et al.* 2018).

Fusarium perekonna seeneliigid on laialt levinud üle maailma ja nad võivad esineda väga erinevates kliimatsioonides (Lõiveke 2008; Nelson *et al.* 1994). Hulgaliselt leidub neid kõikides kultuuristatud muldades ja vähem levinud on nad looduslikes muldades (Nelson *et al.* 1994). Lisaks mullale leidub neid taimeosades, taimejäänustes ja muus orgaanilises materjalis (*Ibid.*). Elulaadilt võivad *Fusarium* liigid olla elusate taimede parasiidid, surnud orgaanilise aine lagundajad ehk saprotroofid või olla isegi taimedega sümbioosis ehk endofüüdid (Lõiveke 2008). Endofüütidena võivad *Fusarium* liigid elada taimede sees latentses olekus, ilma, et nad põhjustaks nähtavaid haigussümptomeid ja peremeestaime hukkudes jätkavad elu saprotroofsena (Zakaria, Ning 2013). Sümbioosis olles võivad nad isegi soodustada taime kasvu ja kaitsta teda erinevate stressorite eest (Lõiveke 2008; Zakaria, Ning 2013). Üldiselt on sümbiootiline suhe siiski mööduv nähtus ja seen võib muutuda taimele patogeeniks kui toimub peremeestaime nõrgestumine erinevate stressorite tagajärjel (*Ibid.*). Selle tõttu kutsutakse *Fusarium* perekonna liike ka üldistavalt fakultatiivseteks parasiitideks, mille omadused kõiguvad parasitismist sümbioosini (Lõiveke 2008).

Enamik *Fusarium* perekonna liike esineb mitesugulise paljunemise järgus (anamorf), suguline staadium (teleomorf) on tuvastatud vähestel liikidel (Aoki *et al.* 2014; Lõiveke 2008). Olenevalt liigist ja arengujärgust on nad võimelised produtseerima erinevat tüüpi eoseid: mitesugulise paljunemise järgus makrokoniide, mikrokoniide, klamüdospoore ja sugulises arengujärgus

kotteoseid ehk askospoore (Ma *et al.* 2013). Makrokoniidid on pikad, mitmerakulised ja kanuu- või banaanikujulised (Glenn 2007). Nende kuju on üheks põhiliseks *Fusarium* perekonna morfoloogiliseks määramistunnuseks. Mullas suudavad *Fusarium* liigid säilida mütseelina, makro- ja mikrokoniididena ja klamüdospooridena, millest kõige püsivamad on klamüdospoorid (Okungbowa, Shittu 2014). Taimi nakatavad *Fusarium* liigid üldiselt mulla kaudu tungides nende juurtesse või levides taimede maapealsetele osadele eostega, mida kannavad edasi ka tuul ja vesi (Leslie, Summerell 2006; Ma *et al.* 2013). Nakatumise käigus produtseeritud eosed võivad edasi levida uutele taimedele või sattuda peale peremeestaime hävimist taimejäänustega uuesti mulda (Okungbowa, Shittu 2014).

Fusarium perekonna seeneliikide paljunemist soodustab kõrge õhuniiskus ja soe ilm, millele järgnevad jahedamad õhtud (Mycotoxins... 2003). Enamik liike on mesofiilid, nad kasvavad ja arenevad normaalselt 18-28 °C juures (Lõiveke 2008). Anaeroobsed tingimused ja liiga happeline keskkond ei ole *Fusarium* liikide elutegevuseks sobiv, optimaalne kasvukeskkonna pH on vahemikus 3,5-5,0 (Lõiveke 2008; Ogunade *et al.* 2018).

2.1. *Fusarium* liikide poolt produtseeritavad mükotoksiinid

Mükotoksiinid on seente poolt toodetud sekundaarsed metaboliidid, mida toodavad peamiselt *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* ja *Alternaria* perekondadesse kuuluvad seened (Anfossi *et al.* 2016). *Fusarium* perekonna liigid võivad produtseerida sadu toksilisi ja potentsiaalselt toksilisi sekundaarseid metaboliite (Munkvold 2017). Kõige levinumad *Fusarium* seente toksiinideks on erinevad trihhotetseenid, fumonisiinid ja zearalenoon (ZEA) (Anfossi *et al.* 2016). Trihhotetseenide rühmast on enimlevinumad mükotoksiinid deoksünivalenool (DON), nivalenool (NIV) ja T-2 ning HT-2 toksiinid (Sobrova *et al.* 2010).

DON on kõige tihedamini esinev mükotoksiin teraviljades ja on hulgaliselt leitud ka inимtoidus ning erinevates loomasöötades (Driehuis *et al.* 2008; Sobrova *et al.* 2010). Põhilisteks DON-i tootvateks liikideks on *F. graminearum* ja *F. culmorum* (Pleadin *et al.* 2019). DON püsib saagis stabiilsena ka säilitustingimustes ja peab vastu jahvatamisele ning muudele tööstlustele, samuti

on DON termostabiilne ja ei lagune ka kuumutamisel 170 °C juures (Pleadin *et al.* 2019; Sobrova *et al.* 2010). Inimestel kutsub esile DON kõhulahtisust, oksendamist, peavalu, palavikku ja peapööritust (Pleadin *et al.* 2019). Loomadel vähendab DON söömust, kutsub esile oksendamist ja pikaajalisel kokkupuutel kahjustab organeid (*Ibid.*).

ZEA on östrogeenne mittesteroidne mükotoksiin, mida toodavad põhiliselt *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis* ja *F. equiseti* (Munkvold 2017). ZEA on samuti termostabiilne ja esineb söödas tihti koos DON-iga, kuna on produtseeritud samu mükotoksiine tootvate liikide poolt (Munkvold 2017; Pleadin *et al.* 2019). Loomadel põhjustab ZEA tänu östrogeeni aktiivsusele eelkõige sigimisprobleeme, suguelundite turset ja atroofiat ning viljatust (*Ibid.*).

2.1.1. Mükotoksiinide esinemine silos

Mükotoksiine tootvad hallitusseened võivad silo saastada erinevatel etappidel. *Fusarium* perekonna seentel toimub see reeglina juba saagikoristuse eelsel ajal põllutingimustes. Sileerimise ja säilitamise ajal võivad sööta saastada näiteks *Penicillium* ja *Aspergillus* perekonna seened (Ogunade *et al.* 2018). Hallitusseente kasvuks ja arenguks on kõige tähtsamad tegurid niiskus, temperatuur ja toitainete ning hapniku olemasolu (Skladanka *et al.* 2013). Mükotoksiinide bioloogiline funktsioon seentes ja nende tootmine pole veel täiesti selge, aga suure tõenäosusega on see seente reaktsioon stressiseisundile (Ponts 2015). Mükotoksiinide produtseerimist seente poolt võivad mõjutada erinevad tegurid nagu temperatuur, sademed, vaba vee aktiivsus, pH ja kahjurite või loomade poolt tekitatud kahjustused (Freire, Sant'Ana 2018; Ogunade *et al.* 2018). Samuti on mükotoksiinide esinemine silos sageli seotud ebapädevate silotootmise- ja põlluharimisvõtetega (Skladanka *et al.* 2013).

Jahedama kliimaga aladel esineb loomasöötades kõige sagedamini DON ja ZEA (Olt 2013; Storm *et al.* 2008). Soojema ja kuivema kliimaga aladel võib sageli esineda söötades lisaks ka aflatoksiine, mida toodavad *Aspergillus* perekonna liigid (Cheli *et al.* 2013; Ogunade *et al.* 2018). Euroopa Liidu poolt on kehtestatud soovituslikud *Fusarium* mükotoksiinide piirnormid loomasöötades. Täiend- ja täissöödas ei tohiks DON-i sisaldus ületada 5000 µg/kg ja ZEA-i sisaldus ületada 500 µg/kg (Commission recommendation 2006/576/EC).

Skladanka *et al.* (2013) andmetel võib mükotoksiinide tase haljasmassis tõusta sileerimis ajal ja varieeruda ka vastavalt niiteajale. Uuringus mõõdeti mükotoksiinide taset värskelt niidetud rohus ja hiljem sellest tehtud silos. Kõige madalam mükotoksiinide tase värskelt niidetud rohus oli juuni ja detsembri alguses ning kõige kõrgem tase oli juuli lõpust novembri alguseni niidetud rohus. DON-i ja ZEA-i tase tõusis peale sileerimist märkimisväärselt, olles silos 3-5 korda kõrgem kui värskelt niidetud haljasmassis. Mükotoksiinide hulga suurenemine silos võib olla põhjustatud närvutamise protsessist ja sileerimise algfaasist. Haljasmassi sileerimisel tõuseb temperatuur ja väheneb hapniku sisaldus, mis tekitab seentel stressi ja kutsub esile mükotoksiinide tootmise. *Fusarium* liigid sileerimisprotsessi üldiselt üle ei ela, aga eelnevalt toodetud mükotoksiinid jäävad silosse püsima (Skladanka *et al.* 2013; Storm *et al.* 2008).

Võrreldes söödateravilja ja maisisiloga on mükotoksiinide esinemist rohusilodes väga vähe uuritud. Poolas läbi viidud uuringus (Panasiuk *et al.* 2019) analüüsiti 120 siloproovi, millest igas ühes leiti vähemalt üks *Fusarium* seente poolt produtseeritav mükotoksiin ja 61% proovidest sisaldas vähemalt 5 või enam mükotoksiini. Sageasemad mükotoksiinid olid DON, NIV, ZEA, boveritsiin ja enniatiinid. DON-i ja ZEA-i keskmised tasemed proovides olid 406 µg/kg ja 80,6 µg/kg, olles maisisilos kõrgemad kui rohusilos. Irimaal läbiviidud uuringus (Mcelhinney *et al.* 2016) leiti rohusilost kõige sagedamini boveritsiini ja erinevaid enniatiine. DON-i sealjuures ei tuvastatud ja ZEA-i kogus oli keskmiselt 53 µg/kg. Sarnased tulemused saadi ka Rootsis ja Norras, kus esines siloproovides kõige enam boveritsiini, enniatiin ja DON-i, kuid puudus ZEA (Schenck *et al.* 2019). Hollandis läbiviidud uuringus (Driehuis *et al.* 2008) leiti siloproovidest kõige tihedamini DON-i ja ZEA-i, olles erinevat tüüpi silodes keskmiselt 273 µg/kg ja 28 µg/kg.

Kõikides eespool mainitud uuringutes leiti, et silos esineb hulgaliselt erinevaid mükotoksiine, kuid madalates kogustes. Mitte ükski tuvastatud mükotoksiin ei ületanud Euroopa Liidu poolt kehtestatud soovituslikke piirnorme. Vaatamata madalatele tasemetele sisaldasid enamik proovidest mitmeid mükotoksiine korraga ning nende esinemist rohusilos ei tohiks ignoreerida. Erinevate mükotoksiinide potentsiaalne sünergistlik mõju ja pikaajaline väikeste koguste mõju loomadele ja inimestele on senini veel uurimata (Driehuis *et al.* 2008; Mcelhinney *et al.* 2016; Panasiuk *et al.* 2019).

2.2. *Fusarium* perekonna süstemaatika

Arvestades *Fusarium* liikide mõju taimede, loomade ja inimeste tervisele, on tähtis, et nende eristamiseks ja klassifitseerimiseks oleks lihtne ja usaldusväärne süsteem. Paraku on *Fusarium* perekonna ja nende liikide süstemaatika väga keeruline ning pidevas muutumises (Nelson *et al.* 1994; Summerell 2019). Hetkel arvatakse olevat *Fusarium* perekonnas 20 erinevat liikide kompleksi ja üle 300 fülogeneetiliselt erineva *Fusarium* liigi, millest vähemalt pooli ei ole veel kirjeldatud (O'Donnell *et al.* 2015; Summerell 2019). Lisaks on nende seas palju krüptilisi liike, mis on omavahel morfoloogiliselt identsed, kuid erineva genoomse järjestusega (*Ibid.*). Viimase 20 aasta märkimisväärsed avastused ja muudatused *Fusarium* perekonna süstemaatikas on toimunud tänu molekulaarsete meetodite kasutuselevõtule nagu DNA sekveneerimine ja polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) (O'Donnell *et al.* 2015).

Kõige suuremat majanduslikku kahju tekitavad *Fusarium* liigid kuuluvad *Fusarium fujikuroi* liikide kompleksi (FFSC), *Fusarium sambucinum* liikide kompleksi (FSAMSC), *Fusarium oxysporum* liikide kompleksi (FOSC) ja *Fusarium solani* liikide kompleksi (FSSC) (Aoki *et al.* 2014). *Fusarium sambucinum* (FSAMSC) liikide kompleksi alla kuulub omakorda *Fusarium graminearum* liikide kompleks (FGSC), mida peetakse üheks kõige ohtlikumaks taimepatogeenide rühmaks maailmas (Dean *et al.* 2012; Iwase *et al.* 2020). Lisaks esineb veel mitmeid tähtsaid liike väljaspool eelnimetatud komplekse, mis võivad põhjustada haiguseid ja toota mükotoksiine nagu *Fusarium avenaceum* ja *Fusarium tricinctum* (Munkvold 2017).

2.2.1. *Fusarium* liigid

Fusarium graminearum Schwabe kuulub *Fusarium graminearum* liikide kompleksi (FGSC) ning teda peetakse üheks ohtlikumaks seeneliigiks maailmas, põhjustades suurt majanduslikku kahju ja saagikadu eelkõige teraviljadel ning maisil (Munkvold 2017). *F. graminearum* on üks põhilisi teravilja fusariooside tekitajaid, kuid võib põhjustada ka teisi haiguseid erinevatel taimeliikidel (*Ibid.*). Mükotoksiinide osas on *F. graminearum* tuntud kui üks põhilisi DON-i tootvaid liike, aga suudab produtseerida ka ZEA-i, fusariini, NIV-i ja mitmeid teisi

mükotoksiine (Storm *et al.* 2008). Eestis tuvastati *F. graminearum* esimest korda 2011. aastal analüüsitud teraviljaproovidest (Yli-Mattila *et al.* 2012).

Fusarium culmorum (W.G. Smith) kuulub *Fusarium sambucinum* liikide kompleksi (FSAMC) (Munkvold 2017). *F. culmorum* on üks põhilisi teravilja fusariooside tekitajaid jahedama kliimaga piirkondades, lisaks teraviljadele võib ta patogeenne olla ka teistele taimeliikidele (*Ibid.*). Sarnaselt *F. graminearum*´ile toodab *F. culmorum* suures koguses DON-i ja ZEA-d, kuid on võimeline produtseerima ka enniatiine ja moniliformiini (MON) (Iwase *et al.* 2020). Põhja-Euroopas on *F. culmorum* olnud pikka aega põhiline DON-i tootev *Fusarium* liik, kuid viimase aja uuringud on näidanud ka *F. graminearum*´i leviku tõusu jahedama kliimaga maades (Yli-Mattila *et al.* 2012).

Fusarium cerealis (Cooke) Sacc. (sünonüüm *Fusarium crookwellense* Burgess, Nelson & Toussoun) kuulub *Fusarium sambucinum* liikide kompleksi (FSAMC) (Munkvold 2017). *F. culmorum*, *F. graminearum* ja *F. cerealis* on morfoloogiliselt väga sarnased, mistõttu on nende liikide eristamine sageli väga keeruline (Gagkaeva 2010). *F. cerealis* põhjustab paljudel taimeliikidel juure- ja juurekaelahaiguseid ning kuulub koos eelpool mainitud liikidega teraviljade fusarioosi tekitajate hulka (Gagkaeva 2010; Munkvold 2017). Antud liik on oluline haigustekitaja taimedele, aga toksilisuse poolest ei peeta teda nii ohtlikuks kui liike *F. graminearum* või *F. culmorum* (Glenn 2007). Erinevatest mükotoksiinidest suudab *F. cerealis* produtseerida näiteks ZEA-i, NIV-i ja fusariini, aga mitte DON-i (Munkvold 2017). *F. cerealis* on laialt levinud parasvöötmelise kliimaga asukohtades nagu Euroopa, Kanada ja Põhja-Ameerika (Glenn 2007).

Fusarium poae (Peck) Wollenw. kuulub *Fusarium sambucinum* liikide kompleksi (FSAMC) (Munkvold 2017). Sarnaselt eelpool mainitud liikidele on *F. poae* üks teravilja fusariooside tekitajatest ja laialt levinud Euroopa põhja osas (*Ibid.*). Lisaks teraviljadele on teda leitud paljude heintaimede seemnetest (*Ibid.*). *F. poae* on võrreldes teiste fusarioosi tekitajatega vähe uuritud ning üldiselt peetakse teda nõrgemaks patogeeniks kui *F. culmorum* või *F. graminearum* (Stenglein 2009). *F. poae* ei tooda DON-i ega ZEA-d, kuid suudab produtseerida hulgaliselt teisi vähemtuntud mükotoksiine nagu NIV-i, fusariine, boveritsiin ja neosolaniooli (Munkvold 2017).

2.3. *Fusarium* liikide poolt põhjustatud heintaimede haigused

2.3.1. Lumiseen

Lumiseen on haigus, mis võib esineda kõikidel teraviljadel ja kõrrelistel heintaimedel. Nakatunud taimede lehed ja võrsumissõlmed kattuvad peale lume sulamist roosaka, valge või halli seeneniidistiku kirmega ning võivad mädaneda (Lõiveke 2008). Haiguskollete kuivamisel moodustavad hävinud taimeosad paberisarnase kihi ja taimed on pinnasest kergesti väljatõmmatavad (Lõiveke 2008; Ponomareva *et al.* 2021). Taimede nakatumine toimub sügisel või talvel piisava õhuniiskuse juures temperatuuridel 2-8 °C (*Ibid.*). Haiguse arengut soosib lume langemine külmumata maale või paks lumekiht, mille all tõuseb maapinna temperatuur üle 0 °C (Lõiveke 2008). Haigustekitajad säilivad taimejäänustel, seemnetes ja mullas ning levivad lülieostega (*Ibid.*). Lumiseene põhilised haigustekitajad on *Microdochium nivale* ja *M. majus*, mis teadaolevalt mükotoksiine ei tooda (Chelkowski *et al.* 1991; Gagkaeva *et al.* 2020; Kalamees 2000; Ponomareva *et al.* 2021). Lõiveke (2008) andmetel võivad lisaks *Microdochium* perekonna liikidele ka *F. culmorum*, *F. avenaceum* ja perekond *Typhula* liigid lumiseent põhjustada.

2.3.2. Kõrreliste juurekaelamädanik ja fusarioos

Juurekaelamädaniku puhul tekivad taimedel kõrsumise faasis pruunikad laigud või pikitriibud alumistele lehetuppedele ja kõrtele (Lõiveke 2008). Haiguskollete kohal ja ümber võib tekkida roosakas seeneniidistik ning taime juurekael mädaneb (*Ibid.*). Haiged taimed on kergesti väljatõmmatavad, kõrred murduvad ja taimed võivad anda kõlujaid terasid (Bender 2006a; Lõiveke 2008). Taimede haigestumine on intensiivne temperatuuril 15-20 °C, seente kasvu soodustab kõrge õhuniiskuse ja kõikuv mulla veerežiim (Lõiveke 2008).

Fusarioos ehk punakaste on üks tõsisemaid teraviljahaiguseid maailmas, põhjustades sageli suurt saagikadu ning terade saastumist mükotoksiinidega (Feksa *et al.* 2019; Parry *et al.* 1995). Fusarioosi nakatumine toimub õitsemise faasis või pisut varem ning haiguskolded tekivad

lehtedele, kõrtele, pähikutele ja peadele (Lõiveke 2008). Haigestunud taime libled muutuvad heledaks ja pähikud võivad tühjaks jääda, hiljem areneb haiguskolletele roosakas seeneniidistik (*Ibid.*). Lõiveke (2008) andmetel võib fusarioos esineda ka heintaimedel, kuid muu kirjanduse põhjal puuduvad täpsed andmed selle haiguse mõjust heintaimedele.

Kõrreliste juurekaelamädanik ja fusarioos on laialt levinud kõrreliste sugukonda kuuluvate taimede seas, mõlema haiguse tekitajateks on mitmed *Fusarium* perekonna liigid. Nende seast on enim levinud *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. oxysporum*, *F. gibbosum*, *F. sporotrichioides* ja *M. nivale* (Lõiveke 2008; Parry *et al.* 1995).

2.3.3. Liblikõieliste juure- ja juurekaelamädanik

Liblikõielistel heintaimedel, eelkõige lutsernil ja ristikutel põhjustavad *Fusarium* perekonna liigid põhiliselt juure- ja juurekaelamädanikku (Öhberg 2008; Pegg, Parry 1983). Mõlemad haigused võivad taimi hävitada olenemata kasvufaasist, kuid suurimad kahjustused tekivad vanematel ning nõrgestatud taimedel. Eriti vastuvõtlikud on taimed kevadel peale ebasoodsaid talvitumistingimusi (Öhberg 2008). Nakatanud idandite juurekael peeneneb ja taimed võivad närbuda, vanematel taimedel hakkab varre alumine osa mädanema (Bender 2006a). Haigete taimede lehed kolletuvad ning juurekaelal on ristlõikes näha pruunistunud juhtkimpe (*Ibid.*). Niiskemates tingimustes võib haiguskollete kohale tekkida ka seeneniidistiku kirme. Antud haiguseid põhjustavad *Fusarium* liigid võivad erineda vastavalt geograafilisele asukohale, kirjanduse põhjal on levinumad haigustekitajad *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. culmorum*, *F. graminearum* (Öhberg 2008; Pegg, Parry 1983; Uddin, Knous 1991).

3. FUNGITSIIDID

Fusarium liikide tõrjeks teraviljadel kasutatakse sageli triasoolide ja strobiluriinide gruppi kuuluvaid fungitsiide, millest triasoolid on katsetes parimaid tulemusi näidanud (Blandino, Reyneri 2009; Bonfada *et al.* 2019). Kirjanduses ei leidu andmeid, mis kirjeldaksid fungitsiidide mõju heintaimikus esinevatele *Fusarium* liikidele ning nende toodetavatele mükotoksiinidele. Lisaks ei ole Eestis heintaimede peal fungitsiidikatseid varem läbi viidud. Antud uurimistöös valiti fungitsiidideks Juventus® 90 ja Mirador 250 SC. Esimene neist sisaldab toimeainet metkonasool ning seda kasutatakse Eestis peamiselt seenhaiguste tõrjeks teraviljal ja rapsil (Juventus 90 2021). Teine preparaat sisaldab toimeainet asoksüstrobiin ning seda kasutatakse Eestis seenhaiguste tõrjeks teraviljadel, rapsil, erinevatel köögiviljadel ja golfimurudel (Mirador 250 SC 2021).

3.1. Metkonasool

Metkonasool on laia tõrjespektriga süsteemne triasool, mis kuulub demetülaasi inhibiitorite (DMI) gruppi (FRAC-kood 3; G1) ning millel on keskmine ristresistentsuse tekke võimalus (FRAC Code List 2021). Metkonasool takistab ergosterooli biosünteesi, mis on vajalik rakumembraani moodustumiseks ja funktsioneerimiseks seentel (Mueller 2006; Tateishi *et al.* 2014). Selle tagajärjel on nende normaalne kasv ja areng häiritud ning seened hävivad. Metkonasool on laialt kasutusel erinevate põllukultuuride kaitseks ja on efektiivne toimeaine paljude seenpatogeenide tõrjeks (Li *et al.* 2021).

Triasoolid nagu metkonasool ja tebukonasool on teravilja katsetes edukalt vähendanud fusariooside levikut ja mükotoksiinide hulka saagis (Anderson *et al.* 2020; Lõiveke 2008; Tateishi *et al.* 2014). Paul *et al.* (2008) andmetel vähenes nesus peale metkonasooliga töötlemist haiguse esinemine 50% ja DON-i sisaldus 45%. Sarnaseid tulemusi saadi ka Saksamaal, kus

metkonasooli kasutamine annusega 1,5 l/ha vähendas õlleodras fusariooside esinemist 54-91%, DON-i sisaldust 65,5-81,4% ja tõstis saagikust 13,8-18,4% (Lõiveke 2008).

3.2. Asoksüstrobiin

Asoksüstrobiin on laia tõrjespektriga süsteemne strobiluriin, mis kuulub kinooni välisinhibiitorite (QoI) klassi (FRAC-kood 11; C3) ning millel on suur ristresistentsuse tekke võimalus (FRAC Code List 2021). Ristresistentsuse ohu tõttu on soovitatav asoksüstrobiini kasutada koos teistesse gruppidesse kuuluvate toimeainetega. Asoksüstrobiin pärsib seentel mitokondriaalset hingamist ja seetõttu katkestab nende elutsükli (Feng *et al.* 2020). Strobiluriinid on kiired ja efektiivsed toimeained, kuid nende väga spetsiifilise toimemehhanismi tõttu on nad vastuvõtlikud resistentsusele (*Ibid.*). Asoksüstrobiin on maailmas laialt kasutusel olev toimeaine, mida kasutatakse eelkõige teraviljadel ja köögiviljades levivate seenhaiguste tõrjeks (Ju *et al.* 2019).

Teraviljakatsetes on asoksüstrobiini mõju fusarioosi tõrjel olnud tagasihoidlik või olematu (Edwards *et al.* 2001; Pirgozliev *et al.* 2002). Mõnedes katsetes on strobiluriinide kasutamine põhjustanud fusarioosi intensiivistumist ja isegi suurendanud mükotoksiinide hulka saagis võrreldes kontrollgruppidega (Bonfada *et al.* 2019; Lõiveke 2008). Fusariooside tõrjeks soovitatakse kasutada asoksüstrobiini ainult koos teiste fungitsiididega. Häid tulemusi on saadud strobiluriinide ja triasoolide segamisel (Bonfada *et al.* 2019; Feksa *et al.* 2019; Lõiveke 2008; Pirgozliev *et al.* 2002).

4. MATERJAL JA METOODIKA

4.1. Katseala iseloomustus ja fungitsiididega töötlemine

Katse viidi läbi Harjumaal, Jõelähtme vallas, Saha külas. Uuritav kultuurrohumaa kuulus Aatmaa OÜ-le, mille põllumassiivi number on 55658860750 ja suuruseks 13,8 hektarit (PRIA veebikaart 2021). Rohumaa botaanilisse koosseisu kuulusid punane ristik (*Trifolium pratense* L.), harilik aruhein (*Festuca pratensis* Huds.), harilik timut (*Phleum pratense* L.) ja karjamaa-raihein (*Lolium perenne* L.). Tegu oli neljanda aasta rohumaaga. Katseala mullaliigiks oli valdavalt leostunud muld (Ko), kuid vähesel määral esines ka gleistunud leostunud mulda (Kog) ning lõimiseks oli kerge liivsavi (Is) (Mullastiku kaart 2021). Mulla harimiseks kasutas tootja minimeeritud harimisviisi.

Katseala koosnes neljast väljamõõdetud katselapist, mis tähistati vastavalt fungitsiiditöötlusele F1, F2, F3 ja K (joonis 2). Iga katselapi suurus oli 24 x 200 meetrit ning F1 katselapi ja sõidutee vahel paiknes puhverala, mille laiuseks oli 4 meetrit.



Joonis 2. Rohumaa ja katselappide asukoht ning paigutus (PRIA veebikaart 2021).

Esimest katselappi (F1) töödeldi fungitsiidiga Juventus® 90 (toimeaine metkonasool 90 g/l, BASF, Ludwigshafen, Saksamaa) kulunormiga 1 l/ha. Teisel katselapil (F2) kasutati fungitsiidi Mirador 250 SC (toimeaine asoksüstrobiin 250 g/l, Syngenta Crop Protection AG, Basel, Šveits) kulunormiga 0,4 l/ha. Kolmandat katselappi (F3) töödeldi mõlema fungitsiidi seguga, eelnevalt nimetatud kulunormidega ning neljas katselapp oli kontroll (K), millel fungitsiiditöötlust läbi ei viidud. Nimetatud fungitsiidid toimivad süsteemselt ning nende ooteaeg on 35 päeva (Taimekaitsevahendite register 2021). Kuna kumbki fungitsiid ei ole registreeritud rohumadele kasutamiseks, siis antud katse jaoks taotleti eriluba (lisa 1 ja lisa 2). Fungitsiididega töötlemine viidi läbi üks kord kasvuperioodi alguses (04.05.2020).

4.2. Proovide kogumine

Rohuproovid koguti vahetult enne fungitsiididega töötlemist (04.05.2020) ja 42 päeva pärast töötlemist (15.06.2020). Proovid lõigati esimesel kogumisel umbes 5 cm kõrguselt ja teisel korral 10 cm kõrguselt maapinnast desinfitseeritud kääridega ning koguti kilekottidesse. Iga katselapi rohuproov koosnes neljast osaproovist, mis koguti katselapi keskelt iga 40 m järelt, jättes otstesse 20 m puhverala. Uue katselapi peale liikudes desinfitseeriti käärid ja käed 70% etanooliga. Kõik proovid säilitati peale kogumist lühiajaliselt +4 °C juures ning seejärel kuivatati kuivatuskapis +50 °C juures 24 tundi.

Peale rohuproovide kogumist teostati katsealal esimene niide ning rohusilo valmistamise jaoks koguti ka igalt katselapilt vajalik kogus rohtu. Vastavalt rohusilo tootmise tehnoloogiale närvutati kogutud proovid 20 tundi Eesti Maaülikooli Söötmisteaduse õppetooli hoones. Peale närvutamist kuivatati proovid kuivatuskapis +50 °C juures 24 tundi.

4.3. *Fusarium* liikide molekulaarne määramine

4.3.1. DNA eraldamine rohuproovidest

DNA eraldamiseks jahvatati nii närvutatud kui ka tavalised kuivatatud rohuproovid. Steriilsetesse 2 ml Eppendorf tuubidesse kaaluti välja 0,03 g jahvatatud proovi ning lisati kolm steriilset metallkuulikest. Igast katselapi rohuproovist tehti kolm kordust. Rohuproovide homogeniseerimiseks raputati läbi kõik proovid Retsch MM 400 homogenisaatoris (Retsch GmbH, Haan, Saksamaa). DNA eraldamine viidi läbi kasutades komplekti DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN N.V., Hilden, Saksamaa) vastavalt tootjapoolsele protokollile. Proovide DNA kontsentratsioon mõõdeti NanoDrop 2000 spektrofotomeetriga (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA). Eraldatud DNA proovid säilitati -20 °C juures.

4.3.2. PCR *Fusarium* perekonnaspetsiifiliste praimeritega

Rohuproovidest eraldatud DNA amplifitseeriti polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) meetodil. Antud tööl puhul kasutati *nested* PCR-i. Vastavalt *Nested* PCR-i metoodikale teostati kaks järjestikust amplifikatsioonireaktsiooni, kus mõlema reaktsiooni puhul kasutati erinevaid praimeripaare. Esimese PCR-i produkti kasutati teise PCR-i matriitsina, kuna selle tulemusel suureneb reaktsiooni spetsiifilisus ja tundlikus (Green, Sambrook 2019). Antud reaktsioonides kasutati *Fusarium* perekonnaspetsiifilisi praimereid, mille sihtmärgiks on translatsiooni elongatsioon faktor *TEF1* geen (Edel-Hermann *et al.* 2015). Esimeses reaktsioonis kasutati praimereid Fa+7 (5'-AACGTCGTCGTCATCGGCCACGTCGACTCT-3') ja Ra+6 (5'-ACATACCAATGACGGTGACATAGTAGCG-3') (Karlsson *et al.* 2016). Teises reaktsioonis kasutati praimereid Fa (5'-TCGTCATCGGCCACGTCGACTCT-3') ja Ra (5'-CAATGACGGTGACATAGTAGCG-3') (Edel-Hermann *et al.* 2015). Mõlema reaktsiooni segud olid lõppmahuga 25 µl ning segude komponendid on välja toodud tabelis 1.

Tabel 1. *Nested* PCR segude koostised

Esimene PCR	Kogus
5x HOT FIREPol Blend Master Mix 12,5 mM MgCl ₂ (Solis Biodyne, Tartu, Eesti)	5 µl
<i>Fw</i> -praimer Fa+7 (20 mM)	0,5 µl
<i>Rw</i> -praimer Ra+6 (20 mM)	0,5 µl
PCR-i kvaliteediga vesi	18 µl
DNA	1 µl
Teine PCR	Kogus
5x HOT FIREPol Blend Master Mix 12,5 mM MgCl ₂ (Solis Biodyne, Tartu, Eesti)	5 µl
<i>Fw</i> -praimer Fa (20 mM)	0,25 µl
<i>Rw</i> -praimer Ra (20 mM)	0,25 µl
PCR-i kvaliteediga vesi	18,5 µl
DNA (esimese PCR-i produkt)	1 µl

PCR-id viidi läbi masinaga Eppendorf Mastercycler® nexus (Eppendorf AG, Hamburg, Saksamaa). Mõlema reaktsiooni puhul viidi esmane denatureerimine läbi temperatuuril 95 °C 15 minutit. Järgnes 30 korduvat tsüklit, mis koosnesid denatureerimisest temperatuuril 94 °C 1 minut, praimerite seondumisest 1 minut (Fa+7/Ra+6 praimeripaari puhul 67 °C ja Fa/Ra puhul 69 °C) ja elongatsioonist temperatuuril 72 °C 1 minut. Reaktsiooni lõpetas pikk elongatsiooni etapp temperatuuril 72 °C 10 minutit. Reaktsioonidele lisati ka negatiivne ja positiivne kontroll, milleks olid vastavalt steriilne destilleeritud vesi ning eelnevalt sekveneeritud *Fusarium graminearum*'i puhaskultuur. PCR-i produkte kontrolliti 1% agarosgeelil ning visualiseeriti Uvidoc HD6 UV-transillumiinatis (Uvitec Ltd, Cambridge, Inglismaa). Markerina kasutati Solis Biodyne 100 bp DNA Ladderit (Solis Biodyne, Tartu, Eesti).

4.3.3. PCR *Fusarium* liigispetsiifiliste praimeritega

Rohuproovides leiduvate *Fusarium* liikide kindlakstegemiseks katsetati antud töös erinevaid liigispetsiifilisi praimereid (lisa 3). Iga praimeripaariga teostati gradient PCR vastava puhaskultuuriga, mille käigus tehti kindlaks praimerite optimaalne seondumistemperatuur.

Toimivate praimeritega teostati seejärel PCR katselappidelt kogutud rohuproovidega. Erinevad puhaskultuurid gradient PCR-i ja PCR-i positiivseteks kontrollideks telliti Hollandist, Westerdijki Instituudist. Kuna paljud praimerid osutusid mittespetsiifilisteks või ei andnud soovitud tulemusi, tuuakse siinkohal välja ainult praimerid, mida kasutati lõplikus analüüsis. Kõiki PCR-i produkte kontrolliti 1% agarosgeelil ning visualiseeriti Uvidoc HD6 UV-transilluminaatoris (Uvitec Ltd, Cambridge, Inglismaa). Markerina kasutati Solis Biodyne 100 bp DNA Ladderit (Solis Biodyne, Tartu, Eesti).

Fusarium graminearum'i määramiseks teostati PCR praimeritega Fg16NF (5'-ACAGATGACAAGATTCAGGCACA-3') ja Fg16NR (5'-TTCTTTGACATCTGTTCAACCCA-3') (Nicholson *et al.* 1998). Reaktsiooni segu sisaldas 5 µl 5x HOT FIREPol Blend Master Mixi (Solis Biodyne, Tartu, Eesti), 1 µl *Fw* ja *Rw* praimerit (20 mM), 1 µl DNA-d ja 12 µl PCR-i kvaliteediga vett. Reaktsiooni esmane denatureerimine viidi läbi temperatuuril 95 °C 15 minutit. Järgnes 40 korduvat tsüklit, mis koosnesid denatureerimisest temperatuuril 92 °C 30 sekundit, praimerite seondumisest temperatuuril 58 °C 45 sekundit ja elongatsioonist temperatuuril 75 °C 30 sekundit. Reaktsiooni lõpetas pikk elongatsiooni etapp temperatuuril 72 °C 10 minutit. Kontrolliks lisati ka negatiivne ja positiivne kontroll, milleks olid vastavalt steriilne destilleeritud vesi ning *Fusarium graminearum*'i puhaskultuur.

Fusarium culmorum'i määramiseks teostati PCR praimeritega OPT18F (5'-GATGCCAGACCAAGACGAAG-3') ja OPT18R (5'-GATGCCAGACGCACTAAGAT-3') (Schilling *et al.* 1996). Reaktsiooni segu sisaldas 5 µl 5x HOT FIREPol Blend Master Mixi (Solis Biodyne, Tartu, Eesti), 0,7 µl *Fw* ja *Rw* praimerit (20 mM), 2 µl DNA-d ja 16,6 µl PCR-i kvaliteediga vett. Reaktsiooni esmane denatureerimine viidi läbi temperatuuril 95 °C 15 minutit. Järgnes 40 korduvat tsüklit, mis koosnesid denatureerimisest temperatuuril 94 °C 30 sekundit, praimerite seondumisest temperatuuril 64 °C 45 sekundit ja elongatsioonist temperatuuril 72 °C 45 sekundit. Reaktsiooni lõpetas pikk elongatsiooni etapp temperatuuril 72 °C 10 minutit. Kontrolliks lisati ka negatiivne ja positiivne kontroll, milleks olid vastavalt steriilne destilleeritud vesi ning *Fusarium culmorum*'i puhaskultuur.

Fusarium cerealis'e määramiseks teostati PCR praimeritega CRO-AF (5'-CTCAGTGTCCACCGCGTTGCGTAG-3') ja CRO-AR (5'-

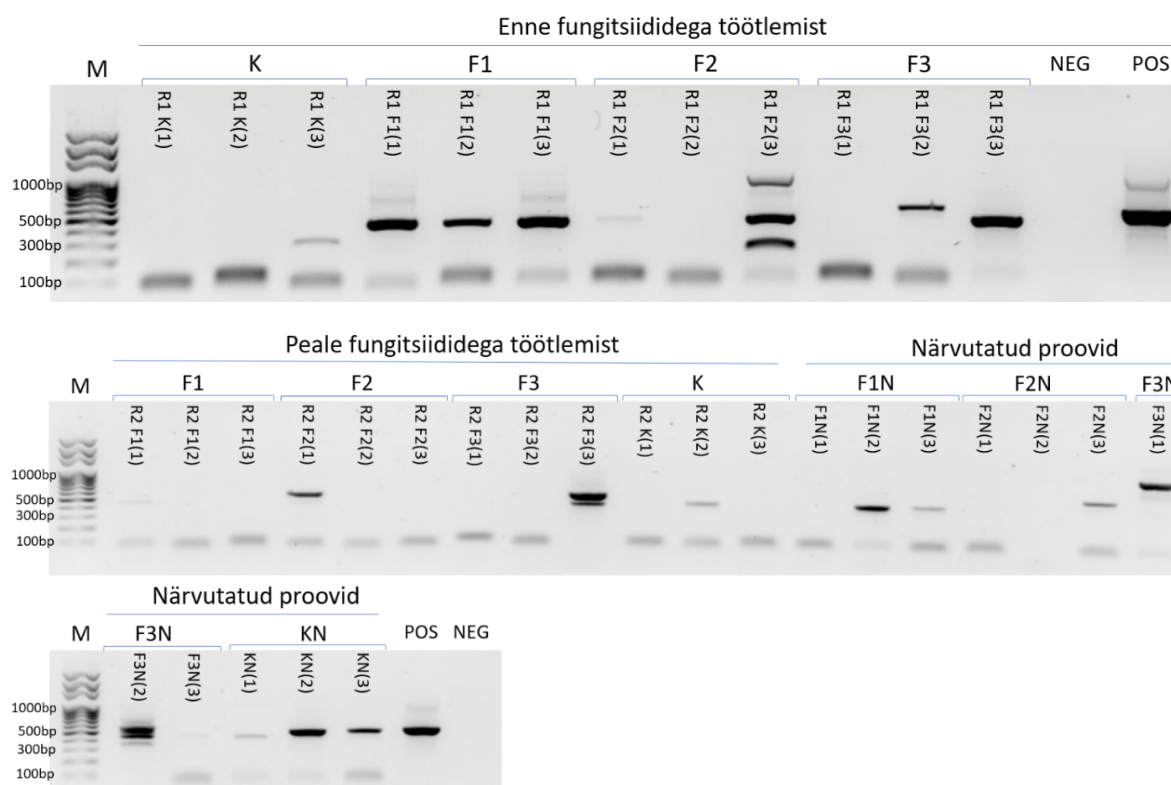
CTCAGTGTCCCATCAAATAGTCC-3') (Yoder, Christianson 1998). Reaktsiooni segu sisaldas 5 µl 5x HOT FIREPol Blend Master Mixi (Solis Biodyne, Tartu, Eesti), 1 µl *Fw* ja *Rw* praimerit (25 mM), 1 µl DNA-d ja 17 µl PCR-i kvaliteediga vett. Reaktsiooni esmane denatureerimine viidi läbi temperatuuril 95 °C 15 minutit. Järgnes 40 korduvat tsüklit, mis koosnesid denatureerimisest temperatuuril 94 °C 60 sekundit, praimerite seondumisest temperatuuril 60 °C 60 sekundit ja elongatsioonist temperatuuril 72 °C 30 sekundit. Reaktsiooni lõpetas pikk elongatsiooni etapp temperatuuril 72 °C 5 minutit. Kontrolliks lisati ka negatiivne ja positiivne kontroll, milleks olid vastavalt steriilne destilleeritud vesi ning *Fusarium cerealis*'e puhaskultuur.

Fusarium poae'e määramiseks teostati PCR praimeritega PoaelGS (5'-CAAGCTCTCCTCGGAGAGTCGAA-3') ja CNL12 (5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3') (Yli-Mattila et al. 2004). Reaktsiooni segu sisaldas 5 µl 5x HOT FIREPol Blend Master Mixi (Solis Biodyne, Tartu, Eesti), 1 µl *Fw* ja *Rw* praimerit (20 mM), 1 µl DNA-d ja 17 µl PCR-i kvaliteediga vett. Reaktsiooni esmane denatureerimine viidi läbi temperatuuril 96 °C 15 minutit. Järgnes 40 korduvat tsüklit, mis koosnesid denatureerimisest temperatuuril 94 °C 30 sekundit, praimerite seondumisest temperatuuril 63 °C 30 sekundit ja elongatsioonist temperatuuril 72 °C 30 sekundit. Reaktsiooni lõpetas pikk elongatsiooni etapp temperatuuril 72 °C 10 minutit. Kontrolliks lisati ka negatiivne ja positiivne kontroll, milleks olid vastavalt steriilne destilleeritud vesi ning *Fusarium poae*'e puhaskultuur.

5. TULEMUSED

5.1. *Fusarium* perekonnaspetsiifiliste praimerite PCR-i tulemused

Fusarium perekonda kuuluvate seente esinemist kõikides kogutud rohuproovides analüüsiti perekonnaspetsiifiliste praimeritega. *Nested* PCR viidi läbi praimeritega Fa+7/Ra+6 ja Fa/Ra (Edel-Hermann *et al.* 2015; Karlsson *et al.* 2016). Positiivseks kontrolliks kasutati *F. graminearum* puhaskultuurist eraldatud DNA-d ning negatiivseks kontrolliks lisati steriilset destilleeritud vett. Joonisel 3 on kujutatud geelpildid PCR-i tulemustest.



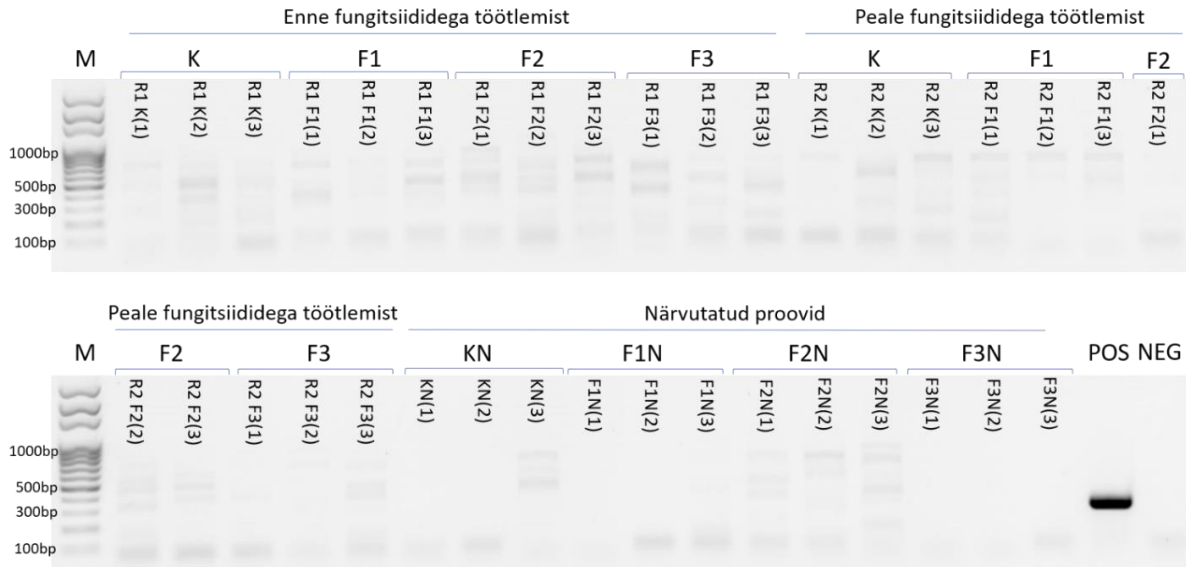
Joonis 3. *Fusarium* perekonnaspetsiifiliste praimerite PCR-i tulemused. K, kontroll katselapp; F1, Juventus 90[®]-ga töödeldud katselapp; F2, Mirador 250 SC-ga töödeldud katselapp; F3, mõlema fungitsiidi seguga töödeldud katselapp; R1, enne fungitsiiditöötlust; R2, pärast fungitsiiditöötlust; N, närvutatud; POS, positiivne kontroll; NEG, negatiivne kontroll.

Fusarium perekonda kuuluvaid seeni tuvastati kokku 21-st rohuproovist (lisa 4). Juventus 90[®] katselapilt (F1) kogutud proovidest olid enne fungitsiidiga töötlust positiivsed kõik proovid ja peale töötlust kogutud proovidest andis positiivse tulemuse üks rohuproov (R2F1(1)) ning kaks närvutatud proovi (F1N(2) ja F1N(3)). Mirador 250 SC katselapilt (F2) kogutud proovidest olid enne töötlust positiivsed kaks proovi (R1F2(1) ja R1F2(3)) ja peale töötlust kogutud proovidest andis positiivse tulemuse üks rohuproov (R2F2(1)) ning üks närvutatud rohuproov (F2N3). Mõlema fungitsiidi seguga töödeldud katselapilt (F3) kogutud proovidest olid enne töötlust positiivsed kaks proovi (R1F3(2) ja R1F3(3)) ja peale töötlust kogutud proovidest andis positiivse tulemuse üks rohuproov (R2F3(3)) ning kõik närvutatud rohuproovid. Kontroll katselapilt (K) andsid positiivse tulemuse proovid R1K(3), R2K(2) ja kõik närvutatud proovid.

5.2. Liigispetsiifiliste praimerite PCR-i tulemused

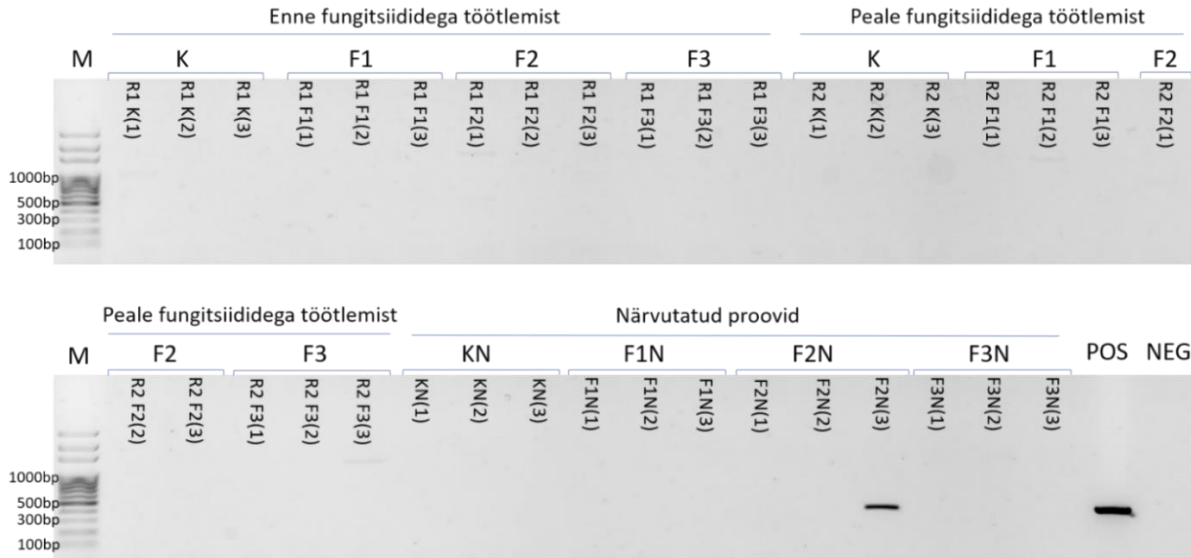
Töös Katsetatud liigispetsiifilistest praimeritest (lisa 3) andsid oodatud tulemuse *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis* ja *F. poae* praimerid, millega teostati ka järgnevad PCR analüüsid. Kõikide proovide PCR analüüsi tulemused on esitatud lisa 4.

F. graminearum'i tuvastamiseks kogutud proovidest kasutati liigispetsiifilisi praimereid Fg16NF ja Fg16NR (Nicholson *et al.* 1998). Positiivseks kontrolliks kasutati *F. graminearum* puhaskultuurist eraldatud DNA-d ning negatiivsesse kontrolli lisati steriilset destilleeritud vett. Joonisel 4 on kujutatud geelipilt PCR-i tulemustest. *F. graminearum*'it ei tuvastatud üheski analüüsitud rohuproovis.



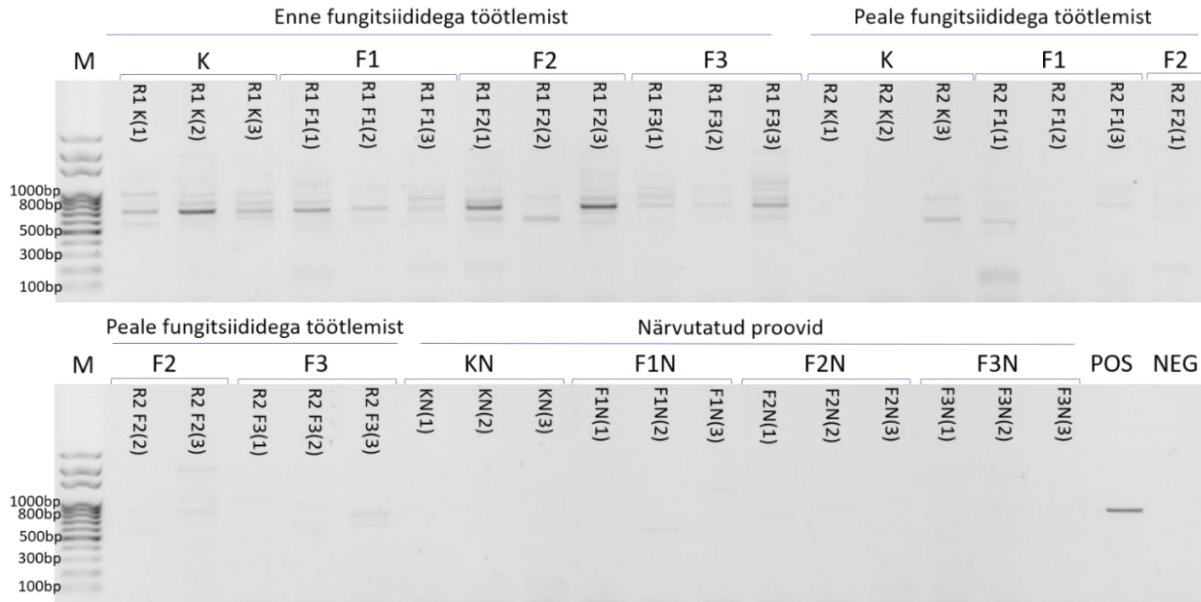
Joonis 4. *F. graminearum* praimeritega läbiviidud rohuproovide PCR-i tulemused. K, kontroll katselapp; F1, Juventus 90[®]-ga töödeldud katselapp; F2, Mirador 250 SC-ga töödeldud katselapp; F3, mõlema fungitsiidi seguga töödeldud katselapp; R1, enne fungitsiiditöötlust; R2, pärast fungitsiiditöötlust; N, närvutatud; POS, positiivne kontroll; NEG, negatiivne kontroll. Oodatud suurusega amplikoni (280 bp) proovidest ei saadud.

F. culmorum’i tuvastamiseks kõikidest kogutud proovidest kasutati liigispetsiifilisi primereid OPT18F ja OPT18R (Schilling *et al.* 1996). Positiivseks kontrolliks kasutati *F. culmorum* puhaskultuurist eraldatud DNA-d ning negatiivsesse kontrolli lisati steriilset destilleeritud vett. Joonisel 5 on kujutatud geelipilt PCR-i tulemustest. *F. culmorum* tuvastati ainult ühest närvutatud rohuproovist (F2N(3)), mis pärines Mirador 250 SC-ga töödeldud katselapilt (F2).



Joonis 5. *F. culmorum* praimeritega läbiviidud rohuproovide PCR-i tulemused. K, kontroll katselapp; F1, Juventus 90[®]-ga töödeldud katselapp; F2, Mirador 250 SC-ga töödeldud katselapp; F3, mõlema fungitsiidi seguga töödeldud katselapp; R1, enne fungitsiiditöötlust; R2, pärast fungitsiiditöötlust; N, närvutatud; POS, positiivne kontroll; NEG, negatiivne kontroll. Positiivseteks tulemusteks loeti amplikonid suurusega 472 bp.

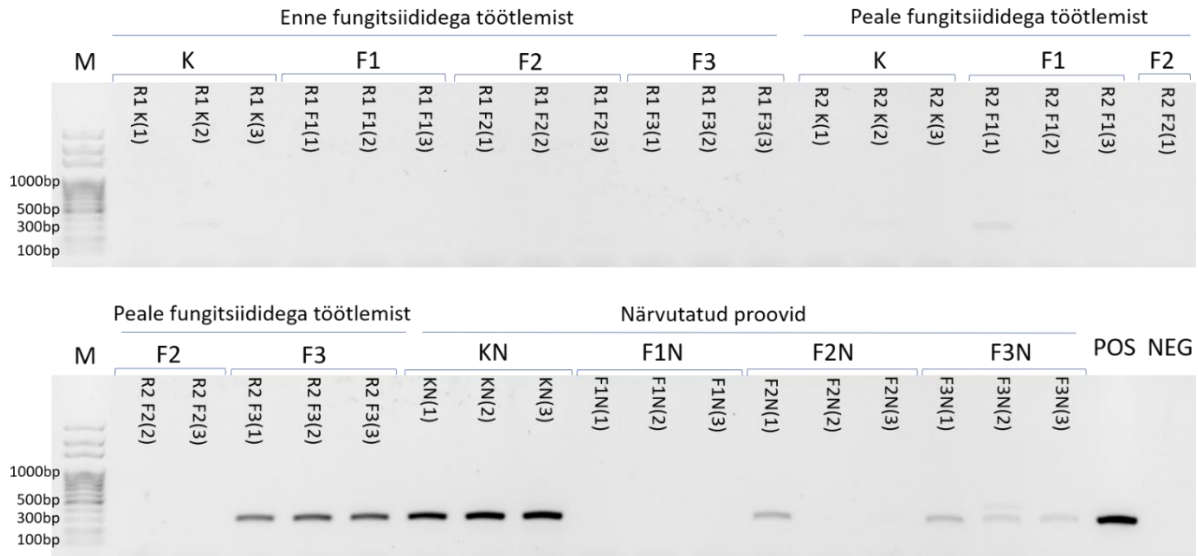
F. cerealis’e tuvastamiseks kõikidest kogutud proovidest kasutati liigispetsiifilisi praimereid CRO-AF ja CRO-AR (Yoder, Christianson 1998). Positiivseks kontrolliks kasutati *F. cerealis* puhaskultuurist eraldatud DNA-d ning negatiivsesse kontrolli lisati steriilset destilleeritud vett. Joonisel 6 on kujutatud geelipilt PCR-i tulemustest.



Joonis 6. *F. cerealis* praimeritega läbiviidud rohuproovide PCR-i tulemused. K, kontroll katselapp; F1, Juventus 90[®]-ga töödeldud katselapp; F2, Mirador 250 SC-ga töödeldud katselapp; F3, mõlema fungitsiidi seguga töödeldud katselapp; R1, enne fungitsiiditöötlust; R2, pärast fungitsiiditöötlust; N, närvutatud; POS, positiivne kontroll; NEG, negatiivne kontroll. Positiivseteks tulemusteks loeti amplikonid suurusega 842 bp.

F. cerealis tuvastati kokku 12-st rohuproovist. Juventus 90[®] katselapilt (F1) kogutud proovidest olid enne töötlust positiivsed kõik proovid ning peale töötlust kogutud proovid ei andnud ühtegi positiivset tulemust. Mirador 250 SC katselapilt (F2) kogutud proovidest olid enne töötlust positiivsed kaks proovi (R1F2(1) ja R1F2(3)) ja peale töötlust kogutud proovidest ei saadud ühtegi positiivset tulemust. Mõlema fungitsiidi seguga töödeldud katselapilt (F3) kogutud proovidest olid enne töötlust positiivsed kõik proovid ja peale töötlust kogutud proovidest andis positiivse tulemuse üks rohuproov (R2F3(3)). Kontroll katselapilt (K) andsid positiivse tulemuse kõik enne töötlust kogutud proovid.

F. poae tuvastamiseks kogutud rohuproovidest kasutati liigispetsiifilisi praimereid PoaelGS/CNL12 (Yli-Mattila *et al.* 2004). Positiivseks kontrolliks kasutati *F. poae* puhaskultuurist eraldatud DNA-d ning negatiivsesse kontrolli lisati steriilset destilleeritud vett. Joonisel 7 on kujutatud geelipilt PCR-i tulemustest.



Joonis 7. *F. poae* praimeritega läbiviidud rohuproovide PCR-i tulemused. K, kontroll katselapp; F1, Juventus 90[®]-ga töödeldud katselapp; F2, Mirador 250 SC-ga töödeldud katselapp; F3, mõlema fungitsiidi seguga töödeldud katselapp; R1, enne fungitsiiditöötlust; R2, pärast fungitsiiditöötlust; N, närvutatud; POS, positiivne kontroll; NEG, negatiivne kontroll. Positiivseteks tulemusteks loeti amplikonid suurusega 306 bp.

F. poae tuvastati kokku 12-st rohuproovist. Juventus 90[®] katselapilt (F1) kogutud proovidest olid enne töötlust kõik proovid negatiivsed ning peale töötlust kogutud proovidest andis üks proov positiivse tulemuse (R2F1(1)). Mirador 250 SC katselapilt (F2) kogutud proovidest olid enne töötlust ning peale töötlust kõik proovid negatiivsed peale ühe närvutatud rohuproovi (F2N(1)). Mõlema fungitsiidi seguga töödeldud katselapilt (F3) kogutud proovidest olid enne töötlust negatiivsed kõik rohuproovid, kuid peale töötlust andsid positiivse tulemuse kõik rohuproovid ja närvutatud rohuproovid. Kontroll katselapilt (K) andsid positiivse tulemuse proov R1K(1) ning kõik närvutatud rohuproovid.

6. ARUTELU JA JÄRELDUSED

Fusarium seente perekonda kuulub mitmeid liike, mis oma elutegevuse käigus võivad toota erinevaid mükotoksiine ja seeläbi avaldada kahjulikku mõju loomade ja inimeste tervisele. Rohkesti on mükotoksiine tootvaid *Fusarium* liike tuvastatud teraviljadelt, aga ka teistelt põllu- ja aiakultuuridelt (Okungbowa, Shittu 2014; Summerell 2019). *Fusarium* perekonna seente tõrjeks ja mükotoksiinide vähendamiseks saagis kasutatakse põhiliselt fungitsiide koos teiste vastavate agrotehnoloogiliste võtetega (Lõiveke 2008; Paul *et al.* 2008). Rohumaadel fungitsiide seenhaiguste tõrjeks ei kasutata, kuid uuringud näitavad, et ka heintaimedes ja nendest tehtavas rohusilos võib esineda *Fusarium* perekonna seeni ning nende poolt toodetud mükotoksiine (Ogunade *et al.* 2018; Panasiuk *et al.* 2019; Skladanka *et al.* 2013). Antud bakalaureusetöös uuriti Eesti heintaimedel levivaid mükotoksiine tootvaid *Fusarium* perekonna liike ja fungitsiidide mõju nende esinemisele.

Traditsiooniliselt on *Fusarium* perekonna seente määramiseks kasutatud morfoloogial põhinevaid meetodeid nagu seente kasvatamine söötmetel ja mikroskopeerimine, kuid need meetodid on töömahukad ning aeganõudvad (Gaviria-Rivera *et al.* 2018). Lisaks traditsioonilistele meetoditele on aastaid juba katsetatud erinevaid praimereid ja PCR protokolle *Fusarium* liikide määramiseks, mida peetakse üldiselt kiiremaks ja täpsemaks (Bluhm *et al.* 2004). Seetõttu kasutati ka antud töös kaasaegsemaid molekulaarmetodeid, kus kombineeriti nii perekonna- kui ka liigispetsiifilisi praimereid. PCR-i põhiseid meetodeid kasutades tuleks esmalt testida põhjalikult nii praimereid kui ka PCR-i protokolle ja vajadusel kombineerida neid sekveneerimisega. Karlsson *et al.* (2016) andmetel on PCR-i põhiste meetoditega häid tulemusi saadud *Fusarium* liikide puhaskultuuridelt eraldatud DNA-d kasutades. Kui analüüsiks kasutatakse bioloogilist materjali (näiteks mulla- või rohuproovid), milles võib esineda hulgaliselt muid mikroorganisme, võivad PCR-is tekkida kõrvalekalded. Mõned liigispetsiifilised praimerid võivad sellistes proovides ülesse amplifitseerida ka teineteisega väga sarnase geneetilise järjestusega seeneliike, mistõttu võidakse *Fusarium* liigid valesti

tuvastada. Ka antud töös katsetati erinevate *Fusarium* liikide määramiseks hulgaliselt praimeripaare, millest töötasid vähesed.

Kasutades *Fusarium* perekonnaspetsiifilisi praimereid tuvastati antud perekonna seente esinemine igal uuritaval katselapil ning liigispetsiifiliste praimeritega tuvastati proovidest kolm erinevat *Fusarium* perekonna liiki. Ohtlikest DON-i ja ZEA-i produtseerivatest liikidest tuvastati ühest rohuproovist *F. culmorum*, mis on koos *F. graminearum*´iga põhilised DON-i ja ZEA-i produtseerivad liigid maailmas (Yörük *et al.* 2016). *F. graminearum*´it peetakse üheks kõige patogeensemaks ja toksilisemaks *Fusarium* liigiks (Munkvold 2017). Eestis on teadaolevalt *F. graminearum*´it varasemalt tuvastatud ainult ühel korral teraviljaproovist (Yli-Mattila *et al.* 2012). Käesolevas katses antud liiki üheski rohuproovis ei tuvastatud. Analüüsitud rohuproovidest tuvastati veel *F. cerealis*, mis produtseerib ZEA-i ja *F. poae*, mis ei produtseeri DON-i ega ZEA-i, küll aga muid trihhotetseene ja teisi vähemtuntud mükotoksiine (Munkvold 2017). Eestis *F. cerealis*´e leviku kohta kirjanduses andmed puuduvad, kuid *F. poae* ja *F. culmorum* on Eestis teraviljadel laialt levinud (Akk *et al.* 2019). Läbiviidud analüüside põhjal saab järeldada, et mükotoksiine tootvad *Fusarium* perekonna liigid on esindatud Eesti heintaimedel, mille tõttu võivad ka rohusilod olla saastunud mükotoksiinidega. Lisaks kinnitavad tulemused, et heintaimedel võivad levida samad *Fusarium* perekonna liigid, mis teraviljadelgi.

Fungitsiidide mõju hindamiseks heintaimikus esinevatele *Fusarium* perekonna liikidele analüüsiti proove enne ja pärast fungitsiididega töötlemist. Tulemused näitasid, et *Fusarium* perekonna liike esines katselappidel ka peale fungitsiididega töötlemist. Fungitsiidide efektiivsus võib sõltuda paljudest faktoritest nagu näiteks ilmast, temperatuurist, taime liigist ja kasvufaasist, patogeeni agressiivsusest, fungitsiidi doosist ja töötlemise ajast (Jackson-ziems *et al.* 2016; Magan *et al.* 2002; Willyerd *et al.* 2012). Liiga varajase töötlemise tõttu võib fungitsiidide kaitsev mõju taimedelt ära kaduda enne patogeensete seente lööbimist ning liiga hiline töötlemine jällegi ei pruugi piisavalt efektiivselt patogeene tõrjuda (Jackson-ziems *et al.* 2016). Rohumaadelt koristatakse saaki mitu korda kasvuperioodi jooksul, mis teeb fungitsiididega töötlemise ajastamise, ooteaja arvestamise ja õigel ajal niidete sooritamise keeruliseks võrreldes näiteks *Fusarium* liikide tõrjega teraviljadel. Kuna rohumaadel pole varem fungitsiidikatseid *Fusarium* liikide tõrjeks läbi viidud, siis ei ole ka hetkel täpselt teada

optimaalne töötlemise aeg ja kuidas näiteks erinevad abiootilised ning biootilised faktorid võivad mõjutada fungitsiidide toimet rohumaaadel.

Lisaks otse heintaimikust korjatud rohuproovidele koguti igalt katselapilt esimese niite ja närvutamise järgselt rohuproove analüüsimiseks. Tulemustest on näha, et ka närvutatud proovides esineb sageli *Fusarium* perekonna liike. Närvutamise ja hallitusseente esinemise vahel olevaid seoseid ei ole palju uuritud ning kirjanduses leidub vähe informatsiooni selle kohta. Lättemäe *et al.* (2000) andmetel võib närvutamine suurendada hallitusseente esinemist rohus ning potentsiaalselt ka mükotoksiinide sisaldust silos (Skladanka *et al.* 2013). Närvutamise kestus põllu peal ja tehnoloogia valik võib samuti mõjutada hallitusseente esinemist rohus (O'Brien *et al.* 2008; Schenck *et al.* 2019). Närvutamine on tähtis etapp silo tootmisel, mistõttu tuleks närvutamise ja hallitusseente leviku ning nende mükotoksiinide vahelisi seoseid edasi uurida.

Töös uuritud fungitsiidide omavaheliseks võrdlemiseks ja mõju täpsemaks hindamiseks on vaja läbi viia korduskatseid ja täiendavaid analüüse. Edasised uuringud hõlmavad endas konventsionaalse PCR-i kõrval ka kvantitatiivset PCR-i (qPCR), mis annab täpsema informatsiooni *Fusarium* perekonna liikide arvukuse kohta ja aitab hinnata fungitsiidide mõju nende arvukusele heintaimikus. Kuna *Fusarium* liikide tuvastamine ei anna veel täpset ülevaadet taimedes või silos esinevate mükotoksiinide ja nende sisalduse kohta, siis teostatakse ka proovide keemiline analüüs koos fungitsiidijääkide määramisega. Täiendavatest analüüsides lähtuvalt saab hinnata, kas fungitsiidide kasutamine rohumaaadel on põhjendatud või mitte.

KOKKUVÕTE

Fungitsiidide kasutamine on põllumajanduses üks põhilisi viise seenhaiguste tõrjumiseks. *Fusarium* perekonna seente efektiivne tõrje põhineb samuti fungitsiidide kasutamisel koos teiste vastavate agrotehniliste võtetega. Rohumaadel fungitsiide haiguste tõrjeks ei kasutata, kuid ka heintaimedel võivad levida *Fusarium* perekonna seened ning uuringud näitavad, et rohusilodes esineb sageli mükotoksiine. Antud bakalaureusetöö eesmärkideks oli välja selgitada Eesti heintaimedes esinevad mükotoksiine tootvad *Fusarium* perekonna liigid ning uurida fungitsiidide mõju nende esinemisele.

Antud töös testiti liikide määramiseks mitmeid erinevaid liigispetsiifilisi praimereid, millest töötasid neli praimeripaari. Molekulaarsete meetoditega tuvastati rohuproovidest kolm *Fusarium* perekonna liiki: *F. culmorum*, *F. poae* ja *F. cerealis*. Kõik kolm kindlaksmääratud liiki võivad põhjustada haiguseid heintaimedel ja toota erinevaid mükotoksiine ning seeläbi rohusilo saastumist põhjustada.

Uurimistöös seatud hüpoteesi, et fungitsiidid vähendavad *Fusarium* perekonna liikide esinemist heintaimikus läbi viidud analüüside põhjal kinnitada ei saa. Kummagi preparaadiga töödeldud aladel esines *Fusarium* liike ka peale fungitsiididega töötlemist. Seatud hüpoteesi kinnitamiseks oleks vaja läbi viia korduskatseid ja täiendavaid analüüse. Lisaks näitasid tulemused *Fusarium* liikide sagedast esinemist närvutatud proovides, mis võib viia mükotoksiinide taseme tõusuni rohusilodes. Närvutamise ja hallitusseente leviku vahelisi seoseid tuleks edasi uurida ja võimalusel leida viise seente leviku takistamiseks närvutamise ajal või närvutamise tehnoloogiat kohandada.

Lõplike järelduste tegemiseks ja fungitsiidide mõju täpseks hindamiseks tuleks läbi viia korduskatseid suurema valimiga ja kombineerida erinevaid molekulaarseid meetodeid keemiliste analüüsidega.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Adojaan, A.** (1961). Rohumaaviljelus Eestis. Tallinn: Eesti Riiklik Kirjastus. 592 lk.
- Akk, E., Edesi, L., Talve, T., Islamov, B., Kütt, M., Lauringson, E., Ilumäe, E., Tamm, K.** (2019). Mükotoksiinid ja Fusarium seened teraviljades. - *Agronomia* 2019, lk 117–128.
- Alonso, V. A., Pereyra, C. M., Keller, L. A. M., Dalcero, A. M., Rosa, C. A. R., Chiacchiera, S. M., Cavaglieri, L. R.** (2013). Fungi and mycotoxins in silage: An overview. - *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 115, No. 3, pp. 637–643.
- Anderson, N. R., Freije, A. N., Bergstrom, G. C., Bradley, C. A., Cowger, C., Faske, T., Hollier, C., Kleczewski, N., Padgett, G. B., Paul, P., Price, T., Wise, K. A.** (2020). Sensitivity of *Fusarium graminearum* to metconazole and tebuconazole fungicides before and after widespread use in wheat in the United States. - *Plant Health Progress*. Vol. 21, No. 2, pp. 85–90.
- Anfossi, L., Giovannoli, C., Baggiani, C.** (2016). Mycotoxin detection. - *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 37, pp.120–126.
- Aoki, T., O'Donnell, K., Geiser, D. M.** (2014). Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: Current status and future challenges. - *Journal of General Plant Pathology*. Vol.80, No. 3, pp. 189–201.
- Baltic Agro. (s.a). Juventus 90. [veebileht] <https://www.balticagro.ee/taimekaitse/fungitsiidid-teraviljale/juventus-90> (29.04.2021).
- Baltic Agro. (s.a). Mirador 250 SC. [veebileht] <https://www.balticagro.ee/taimekaitse/fungitsiidid-teraviljale/mirador-250-sc> (29.04.2021).
- Becker-Algeri, T. A., Castagnaro, D., de Bortoli, K., de Souza, C., Drunkler, D. A., Badiale-Furlong, E.** (2016). Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products: A Review. - *Journal of Food Science*. Vol. 81, No. 3, pp. 544–552.
- Bender, A.** (2006a). Eritüübiliste rohumaaade rajamine ja kasutamine I. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus. 338 lk.
- Bender, A.** (2006b). Eritüübiliste rohumaaade rajamine ja kasutamine II. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus. 415 lk.
- Blandino, M., Reyneri, A.** (2009). Effect of fungicide and foliar fertilizer application to winter wheat at anthesis on flag leaf senescence, grain yield, flour bread-making quality and DON contamination. - *European Journal of Agronomy*. Vol. 30, No. 4, pp. 275–282.

- Bluhm, B. H., Cousin, M. A., Woloshuk, C. P.** (2004). Multiplex Real-Time PCR Detection of Fumonisin-producing and Trichothecene-producing Groups of *Fusarium* Species. - *Journal of Food Protection*. Vol. 67, No. 3, pp. 536-543.
- Bonfada, É. B., Honnef, D., Friedrich, M. T., Boller, W., Deuner, C. C.** (2019). Performance of fungicides on the control of fusarium head blight (*Triticum aestivum* L.) and deoxynivalenol contamination in wheat grains. - *Summa Phytopathologica*. Vol. 45, No. 4, pp. 374–380.
- Carlier, L., Rotar, I., Vlahova, M., Vidican, R.** (2009). Importance and functions of grasslands. - *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. Vol. 37, No. 1, pp. 25–30.
- Cheli, F., Campagnoli, A., Dell’Orto, V.** (2013). Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. - *Animal Feed Science and Technology*. Vol. 183, No. 1-2, pp. 1-16.
- Chelkowski, J., Goliński, P., Perkowski, J., Visconti, A., Rakowska, M., Wakuliński, W.** (1991). Toxinogenicity of *Microdochium nivale* (*Fusarium nivale*) isolates from cereals in Poland. - *Mycotoxin Research*. Vol. 7, No. 2, pp. 140–145.
- Cogan, T., Hawkey, R., Higgie, E., Lee, M. R. F., Mee, E., Parfitt, D., Raj, J., Roderick, S., Walker, N., Ward, P., Wilkinson, J. M.** (2017). Silage and total mixed ration hygienic quality on commercial farms: implications for animal production. - *Grass and Forage Science*. Vol. 72, No. 4, pp. 601–613.
- Commission recommendation 2006/576/EC. (2006). Official Journal of the European Union. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006H0576&from=EN> (29.04.2021).
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G. D.** (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. - *Molecular Plant Pathology*. Vol. 13, No. 3, pp. 414-430.
- Driehuis, F., Spanjer, M. C., Scholten, J. M., Te Giffel, M. C.** (2008). Occurrence of mycotoxins in feedstuffs of dairy cows and estimation of total dietary intakes. - *Journal of Dairy Science*. Vol. 91, No. 11, pp. 4261–4271.
- Dunière, L., Sindou, J., Chaucheyras-Durand, F., Chevallier, I., Thévenot-Sergentet, D.** (2013). Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms.- *Animal Feed Science and Technology*. Vol. 182, No. 1-4, pp. 1-15.
- Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Mounier, A., Steinberg, C.** (2015). *Fusarium* diversity in soil using a specific molecular approach and a cultural approach. - *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 111, pp. 64–71.
- Edwards, S. G., Pirgozliev, S. R., Hare, M. C., Jenkinson, P.** (2001). Quantification of Trichothecene-Producing *Fusarium* Species in Harvested Grain by Competitive PCR to Determine Efficacies of

- Fungicides against Fusarium Head Blight of Winter Wheat.- *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 67, No. 4, pp. 1575–1580.
- Feksa, H. R., Do Couto, H. T. Z., Garozi, R., De Almeida, J. L., Gardiano, C. G., Tessmann, D. J.** (2019). Pre- and postinfection application of strobilurin-triazole premixes and single fungicides for control of fusarium head blight and deoxynivalenol mycotoxin in wheat. - *Crop Protection*. Vol. 117, pp. 128–134.
- Feng, Y., Huang, Y., Zhan, H., Bhatt, P., Chen, S.** (2020). An Overview of Strobilurin Fungicide Degradation: Current Status and Future Perspective. - *Frontiers in Microbiology*. Vol. 11.
- Ferrão, J., Bell, V., Chabite, I., Fernandes, T.** (2017). Mycotoxins, Food and Health. - *Journal of Nutritional Health & Food Science*. Vol. 5, No. 7, pp. 1–10.
- FRAC Code List[®] 2021. (2021). Fungicide Resistance Action Committee. https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2021--final.pdf?sfvrsn=f7ec499a_2 (29.04.2021).
- Freire, L., Sant’Ana, A. S.** (2018). Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. - *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 111, pp. 189-205.
- Gagkaeva, T. Y.** (2010). Phytopathogenic fungus *Fusarium cerealis* in Russia. - *Mikologiya i Fitopatologiya*. Vol. 43, No. 4, pp. 331-341.
- Gagkaeva, T. Y., Orina, A. S., Gavrilova, O. P., Gogina, N. N.** (2020). Evidence of *Microdochium* fungi associated with cereal grains in Russia. – *Microorganisms*. Vol. 8, No. 3.
- Gaviria-Rivera, A., Giraldo-López, A., Santa-Cardona, C., Cano-Restrepo, L.** (2018). Molecular identification of clinical isolates of *Fusarium* in Colombia. - *Rev. Salud Pública*. Vol. 20, pp. 94-102.
- Gibson, D. J.** (2009). Grasses and Grassland Ecology. New York: Oxford University Press. 305 p.
- Glenn, A. E.** (2007). Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. - *Animal Feed Science and Technology*. Vol. 137, No. 3–4, pp. 213–240.
- Green, M. R., Sambrook, J.** (2019). Nested polymerase chain reaction (PCR). - *Cold Spring Harbor Protocols*. Vol. 2019, No. 2.
- Grinienė, R., Gulbinas, J., Kuris, M., Rimmelgas, L., Veidemane, K., Prižavoite, D., Ruskule, A., Fammler, H., Strigune, D.** (2019). Kui palju maksab rohumaa? Rohumaade pakutavate hüvede hindamine ja visualiseerimine uuendusliku GIS töövahendi abil. - *Balti Keskkonnafoorum 2019*.
- Gruber-Dorninger, C., Jenkins, T., Schatzmayr, G.** (2019). Global mycotoxin occurrence in feed: A ten-year survey. – *Toxins*. Vol. 11, No. 7.

- Halstensen, A. S., Nordby, K. C., Eduard, W., Klemsdal, S. S.** (2006). Real-time PCR detection of toxigenic *Fusarium* in airborne and settled grain dust and associations with trichothecene mycotoxins. - *Journal of Environmental Monitoring*. Vol. 8, No. 12, pp. 1235–1241.
- Haritava maa** 2019. aasta turuülevaade. (2019). Tallinn: Maa-amet. https://www.maaamet.ee/sites/default/files/content-editors/kinnisvara/haritava_maa_turuulevaade_2019.pdf (29.04.2021).
- Horevaj, P., Milus, E. A., Bluhm, B. H.** (2011). A real-time qPCR assay to quantify *Fusarium graminearum* biomass in wheat kernels. - *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 111, No. 2, pp. 396–406.
- Iwase, C. H. T., Piacentini, K. C., Giomo, P. P., Čumová, M., Wawroszová, S., Běláková, S., Minella, E. Rocha, L. O.** (2020). Characterization of the *Fusarium sambucinum* species complex and detection of multiple mycotoxins in Brazilian barley samples. - *Food Research International*. Vol. 136.
- Jackson-Ziems, T. A., Giesler, L. J., Harveson, R. M., Wegulo, S. N., Korus, K.** (2016). Fungicide Application Timing and Disease Control. – *Papers in Plant Pathology*. Vol. 486.
- Ju, C., Zhang, H., Yao, S., Dong, S., Cao, D., Wang, F., Fang, H., Yu, Y.** (2019). Uptake, Translocation, and Subcellular Distribution of Azoxystrobin in Wheat Plant (*Triticum aestivum* L.). - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 67, No. 24, pp. 6691–6699.
- Jurado, M., Vázquez, C., Patiño, B., González-Jaén, M. T.** (2005). PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. - *Systematic and Applied Microbiology*. Vol. 28, No. 6, pp. 562–568.
- Kalamees, K.** (2000). Eesti seenestik. Tartu: Eesti Põllumajandusülikooli Zooloogia ja Botaanika Instituut. 558 lk.
- Karlsson, I., Edel-Hermann, V., Gautheron, N., Durling, M. B., Kolseth, A. K., Steinberg, C., Persson, P., Friberg, H.** (2016). Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples. - *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 82, No. 2, pp. 491–501.
- Kulik, T.** (2008). Detection of *Fusarium tricinctum* from cereal grain using PCR assay. - *Journal of Applied Genetics*. Vol. 49. No. 3, pp. 305–311.
- Leslie, J. F., Summerell, B. A.** (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. 388 p.
- Li, L., Huang, P., Li, J.** (2021). Enantioselective effects of the fungicide metconazole on photosynthetic activity in *Microcystis flos-aquae*. - *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 211.

- Loid, H.** (1987). Soovitused rohumaaiviljeluse intensiivistamiseks Lõuna-Eestis. Tallinn: Eesti NSV Agrotööstuskomitee Info- ja Juurutusvalitsus. 24 lk.
- Lõiveke, H.** (1995). Taimekaitse käsiraamat. Tallinn: Põllumajandusministeerium. 389 lk.
- Lõiveke, H.** (2008). Teraviljade fusarioosid Eestis. Saku: Eesti Maaviljeluse Instituut. 77 lk.
- Lättemäe, P., Sarand, R.-J., Kiisk, T.** (2000). Erinevate kindlustuslisandite ja nende doseerimise viiside mõju silo kvaliteedile. - *Akadeemilise Põllumajanduse Seltsi Toimetised 11*
- Ma, L.-J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'donnell, K., Trail, F., Gardiner, D. M., Manners, J. M., Kazan, K.** (2013). *Fusarium* Pathogenomics. - *Annual Review of Microbiology*. Vol. 67, pp. 399-416.
- Maa-ameti geoportaal. (s.a). Mullastiku kaart. [veebileht]
<https://geoportaal.maaamet.ee/est/Ruumiandmed/Mullastiku-kaart-p33.html> (29.04.2021).
- Magan, N., Hope, R., Colleate, A., Baxter, E. S.** (2002). Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. - *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 108, pp. 685-690.
- Mcelhinney, C., Danaher, M., Elliott, C. T., O'Kiely, P.** (2016). Mycotoxins in farm silages - a 2-year Irish national survey. - *Grass and Forage Science*. Vol. 71, No. 2, pp. 339-352.
- Milvaste, E.** (1999). Loodushoidlikud rohumaad. Jäned: Jäned Õppe- ja Nõuandekeskus. 125 lk.
- Mishra, P. K., Fox, R. T., Culham, A.** (2003). Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. - *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 218, No. 2, pp. 329-332.
- Mueller, D. S.** (2006). Fungicides: Triazoles. - *Integrated Crop Management News*. Vol. 1274.
- Munkvold, G. P.** (2017). *Fusarium* species and their associated mycotoxins. - *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1542, pp. 51-106.
- Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems. (2003). Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology.
https://www.cast-science.org/wp-content/uploads/2002/11/CAST_R139_Mycotoxins_Risks_Plant_Animal_Health_Systems.pdf (29.04.2021)
- Nelson, P. E., Dignani, M. C., Anaissie, E. J.** (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. - *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 7, No. 4, pp. 479-504.
- Nicholson, P., Simpson, D. R., Weston, G., Rezanoor, H. N., Lees, A. K., Parry, D. W., Joyce, D.** (1998). Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. - *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Vol. 53, No. 1, pp. 17-37.
- Nicolaisen, M., Suproniene, S., Nielsen, L. K., Lazzaro, I., Spliid, N. H., Justesen, A. F.** (2009). Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. - *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 76, No. 3, pp. 234-240.

- O'Brien, M., O'Kiely, P., Forristal, P. D., Fuller, H. T.** (2008). Fungal contamination of big-bale grass silage on Irish farms: predominant mould and yeast species and features of bales and silage. - *Grass and Forage Science*. Vol. 63, No. 1, pp. 121–137.
- O'Donnell, K., McCormick, S. P., Busman, M., Proctor, R. H., Ward, T. J., Doebring, G., Geiser, D. M., Alberts, J. F., Rheeder, J. P.** (2018). Marasas et al. 1984 “Toxigenic *Fusarium* Species: Identity and Mycotoxicology” revisited. – *Mycologia*. Vol. 110, No. 6, pp. 1058–1080.
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Robert, V. A. R. G., Crous, P. W., Geiser, D. M., Kang, S.** (2015). DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. – *Phytoparasitica*. Vol. 43, No. 5, pp. 583–595.
- Ogunade, I. M., Martinez-Tupia, C., Queiroz, O. C. M., Jiang, Y., Drouin, P., Wu, F., Vyas, D., Adesogan, A. T.** (2018). *Silage review*: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. - *Journal of Dairy Science*. Vol. 101, No. 5, pp. 4034-4059.
- Okungbowa, F. I., Shittu, H. O.** (2014). Fusarium Wilts: An Overview. - *Trends in Environmental Science*. Vol. 6, No. 2, pp. 83-104.
- Older, H.** (2011). Kohalikud söödad. Tartu: Eesti Rohumaade Ühing, 332 lk.
- Olt, A.** (2013). Silo keemiline koostis ja toiteväärtus. Tartu: Eesti Põllu- ja Maamajanduse Nõuandeteenistus. 34 lk.
- Panasiuk, L., Jedziniak, P., Pietruszka, K., Piatkowska, M., Bocian, L.** (2019). Frequency and levels of regulated and emerging mycotoxins in silage in Poland. - *Mycotoxin Research*. Vol. 35, No. 1, pp. 17-25.
- Parry, D. W., Jenkinson, P., McLeod, L.** (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals—a review. - *Plant Pathology*. Vol. 44, No. 2, pp. 207–238.
- Parry, D. W., Nicholson, P.** (1996). Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. - *Plant Pathology*. Vol. 45, No. 2, pp. 383–391.
- Paul, P. A., Lipps, P. E., Hershman, D. E., McMullen, M. P., Draper, M. A., Madden, L. V.** (2008). Efficacy of Triazole-Based Fungicides for Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol Control in Wheat: A Multivariate Meta-Analysis. – *Phytopathology*. Vol. 98, No. 9.
- Pegg, G. F., Parry, D. W.** (1983). Infection of lucerne (*Medicago sativa*) by *Fusarium* species. - *Annals of Applied Biology*. Vol. 103, No. 1, pp. 45–55.
- Pirgozliev, S. R., Edwards, S. G., Hare, M. C., Jenkinson, P.** (2002). Effect of dose rate of azoxystrobin and metconazole on the development of Fusarium head blight and the accumulation of deoxynivalenol (DON) in wheat grain. - *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 108, pp. 469-478.

- Pleadin, J., Frece, J., Markov, K.** (2019). Mycotoxins in food and feed. - *Advances in Food and Nutrition Research*. Vol. 89, pp. 297-345.
- PM028: Kasutatav põllumajandusmaa maakonna järgi. (andmed uuendatud 29.03.2018). – *Eesti Statistika andmebaas*. <http://andmebaas.stat.ee> (29.04.2021).
- PM03: Põllukultuuride kasvupind. (andmed uuendatud 08.08.2018). – *Eesti Statistika andmebaas*. <http://andmebaas.stat.ee> (29.04.2021).
- Ponomareva, M. L., Gorshkov, V. Y., Ponomarev, S. N., Korzun, V., Miedaner, T.** (2021). Snow mold of winter cereals: a complex disease and a challenge for resistance breeding. - *Theoretical and Applied Genetics*. Vol. 134, No. 2, pp. 419–433.
- Ponts, N.** (2015). Mycotoxins are a component of *Fusarium graminearum* stress-response system. - *Frontiers in Microbiology*. Vol. 6.
- Põllumajandus- ja Toiduamet. (s.a). Taimekaitsevahendite register. [veebileht] <https://portaal.agri.ee/avalik/#/taimekaitse/taimekaitsevahendid-otsing/et> (29.04.2021).
- Põllumajanduse Registrite ja Informatsiooni Amet. (2019). Püsirohumaade säilitamine. [veebileht] <https://www.pria.ee/registrid/pusirohumaade-sailitamine> (29.04.2021).
- Põllumajanduse Registrite ja Informatsiooni Amet. (s.a). PRIA Veebikaart. [veebileht] <https://kls.pria.ee/kaart/> (29.04.2021).
- Rodríguez-Blanco, M., Ramos, A. J., Sanchis, V., Marín, S.** (2021). Mycotoxins occurrence and fungal populations in different types of silages for dairy cows in Spain. - *Fungal Biology*. Vol. 125, No. 2, pp. 103–114.
- Schenck, J., Müller, C., Djurle, A., Jensen, D. F., O'Brien, M., Johansen, A., Rasmussen, P. H., Spörndly, R.** (2019). Occurrence of filamentous fungi and mycotoxins in wrapped forages in Sweden and Norway and their relation to chemical composition and management. - *Grass and Forage Science*. Vol. 74, No. 4, pp. 613–625.
- Schilling, A., Möller, E., Geiger, H.** (1996). Polymerase Chain Reaction-Based Assays for Species-Specific Detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*, *Phytopathology*, American Phytopathological Society, 86(5), 515.
- Skladanka, J., Adam, V., Dolezal, P., Nedelnik, J., Kizek, R., Linduskova, H., Alba Mejia, J. E., Nawrath, A.** (2013). How do grass species, season and ensiling influence mycotoxin content in forage?. - *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Vol. 10, No. 11, pp. 6084–6095.
- Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., Kizek, R.** (2010). Deoxynivalenol and its toxicity. - *Interdisciplinary Toxicology*. Vol. 3, No. 3, pp. 94–99.

- Stakheev, A. A., Khairulina, D. R., Ryazantsev, D. Y., Zavriev, S. K.** (2013). Phosphate permease gene as a marker for the species-specific identification of the toxigenic fungus *Fusarium cerealis*. - *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. Vol. 39, No. 2, pp. 153–160.
- Stakheev, A. A., Ryazantsev, D. Y., Gagkaeva, T. Y., Zavriev, S. K.** (2011). PCR detection of *Fusarium* fungi with similar profiles of the produced mycotoxins. - *Food Control*. Vol. 22, No. 3–4, pp. 462–468.
- Stenglein, S. A.** (2009). *Fusarium poae*: A pathogen that needs more attention. - *Journal of Plant Pathology* Vol. 91, No. 1, pp. 25–36.
- Storm, I. M. L. D., Sørensen, J. L., Rasmussen, R. R., Nielsen, K. F., Thrane, U.** (2008). Mycotoxins in silage. - *Stewart Postharvest Review*. Vol. 4, No. 6.
- Summerell, B. A.** (2019). Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. - *Annual Review of Phytopathology*. Vol. 57, pp. 323–339.
- Sõmermaa, A.-L.** (1995). Teraviljahaigused. Tartu: Eesti Põllumajandusülikool. 56 lk.
- Zakaria, L., Ning, C. H.** (2013). Endophytic *Fusarium* spp. from Roots of Lawn Grass (*Axonopus compressus*). - *Tropical life sciences research*. Vol. 24, No. 2, pp. 85–90.
- Tateishi, H., Miyake, T., Mori, M., Sakuma, Y., Saishoji, T.** (2014). Effect of application timing of metconazole on *Fusarium* head blight development and mycotoxin contamination in wheat and barley. - *Journal of Pesticide Science*. Vol. 39, No. 1, pp. 1–6.
- Turner, A. S., Lees, A. K., Rezanoor, H. N., Nicholson, P.** (1998). Refinement of PCR-detection of *Fusarium avenaceum* and evidence from DNA marker studies for phenetic relatedness to *Fusarium tricinctum*. - *Plant Pathology*. Vol. 47, No. 3, pp. 278–288.
- Uddin, W., Knous, T. R.** (1991). *Fusarium* Species Associated with Crown Rot of Alfalfa in Nevada. - *Plant Disease*. Vol. 75, No. 1, pp. 51–56.
- Waalwijk, C., Kastelein, P., De Vries, I., Kerényi, Z., Van Der Lee, T., Hesselink, T., Köhl, J., Kema, G.** (2003). Major changes in *Fusarium* spp. in wheat in the Netherlands. - *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 109, No. 7, pp. 743–754.
- White, R., Murray, S., Rohweder, M.** (2000). Pilot Analysis of Global Ecosystems: Grassland Ecosystems. Washington, D.C: World Resources Institute. 112 p.
- Whitlow, L. W., Hagler, W. M.** (2005). Mycotoxins in dairy cattle: Occurrence, toxicity, prevention and treatment. - *Southwest Nutrition & Management Conference*. pp. 124–138.
- Wilkinson, J. M., Toivonen, M.** (2003). World silage. Lincoln: Chalcombe. 204 p.
- Willyerd, K. T., Li, C., Madden, L. V., Ransom, J. K., Wegulo, S. N., Adey, E. A., Ebelhar, S. E., Paul, P. A.** (2012). Efficacy and Stability of Integrating Fungicide and Cultivar Resistance to

- Manage Fusarium Head Blight and Deoxynivalenol in Wheat. - *Plant Disease*. Vol. 96, No. 7, pp. 957-967.
- Öhberg, H.** (2008). Studies of the Persistence of Red Clover Cultivars in Sweden with Particular Reference to *Sclerotinia trifoliorum*: doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., Konstantinova, P., Gagkaeva, T. Y.** (2004). Molecular and morphological diversity of *Fusarium* species in Finland and northwestern Russia. - *European Journal of Plant Pathology*. Vol. 110, No. 5–6, pp. 573–585.
- Yli-Mattila, T., Parikka, P., Lahtinen, T., Rämö, S., Kokkonen, M., Rizzo, A., Jestoi, M., Hietaniemi, V.** (2008). *Fusarium* DNA levels in finnish cereal grains. - *Current Advances in Molecular Mycology*. pp 107–138.
- Yli-Mattila, T., Rämö, S., Tanner, R., Loiveke, H., Hietaniemi, V.** (2012). *Fusarium* DNA levels as compared to mycotoxin levels in Finnish and Estonian grain samples. - *Plant Breeding and Seed Science*. Vol. 64, No. 1.
- Yoder, W. T., Christianson, L. M.** (1998). Species-specific primers resolve members of *Fusarium* section *Fusarium*. - *Fungal Genetics and Biology*. Vol. 23, No. 1, pp. 68–80.
- Yörük, E., Tunali, B., Kansu, B., Ölmez, F., Uz, G., Zümrüt, I. M., Sarıkaya, A., Meyva, G.** (2016). Characterization of high-level deoxynivalenol producer *Fusarium graminearum* and *F. Culmorum* isolates caused head blight and crown rot diseases in Turkey. - *Journal of Plant Diseases and Protection*. Vol. 123, No. 4, pp. 177–186.

LISAD

Lisa 1. Juventus® 90 kasutamise eriluba



PÕLLUMAJANDUSAMET

OTSUS

Eesti Vabariik

4. mai 2020 nr 12-7/ 98

**Põllumajandusameti taimekaitse ja väetise osakonna
nõuniku 24.04.2020 a otsuse nr 12-7/67
„Loa andmine taimekaitsevahendi teadus- või
arendustöö eesmärgil katse läbi viimiseks“ parandus**

Haldusmenetluse seaduse § 59 ja Põllumajandusameti peadirektori 03.04.2020. a käskkirjaga nr 7-5/6 kinnitatud taimekaitse ja väetise osakonna nõuniku ametijuhendi punkti 4.2. alusel ning lähtudes otsuse vormistamisel tehtud veast:

Parandan Põllumajandusameti taimekaitse ja väetise osakonna nõuniku 24.04.2020 a otsuse nr 12-7/67 „Loa andmine taimekaitsevahendi teadus- või arendustöö eesmärgil katse läbi viimiseks“ asendades tekstiosa „Põllumajandusameti peadirektori 31.01.2020. a käskkirjaga nr 7-1/9“ tekstiosaga „Põllumajandusameti peadirektori 03.04.2020. a käskkirjaga nr 7-5/6“.

Käesolevat otsust on võimalik vaidlustada esitades vaide Põllumajandusameti peadirektorile haldusmenetluse seaduses paragrahvides 75 ja 76 sätestatud korras ning tähtajal või esitades kaebuse Halduskohtusse halduskohtumenetluse seadustikus paragrahvides 7, 38 ja 46 sätestatud korras ja tähtajal.

Saata: Eesti Maaülikooli põllumajandus- ja keskkonnainstituut

Eliise Mesi
taimekaitse ja väetise osakonna nõunik

Lisa 2. Mirador 250 SC kasutamise eriluba



PÕLLUMAJANDUSAMET

OTSUS

Eesti Vabariik

7. mai 2020 nr 12-7/ 101

**Põllumajandusameti taimekaitse ja väetise osakonna
nõuniku 27.04.2020 a otsuse nr 12-7/69
„Loa andmine taimekaitsevahendi teadus- või
arendustöö eesmärgil katse läbi viimiseks“ parandus**

Haldusmenetluse seaduse § 59 ja Põllumajandusameti peadirektori 03.04.2020. a käskkirjaga nr 7-5/6 kinnitatud taimekaitse ja väetise osakonna nõuniku ametijuhendi punkti 4.2. alusel ning lähtudes otsuse vormistamisel tehtud veast:

Parandan Põllumajandusameti taimekaitse ja väetise osakonna nõuniku 27.04.2020 a otsuse nr 12-7/69 „Loa andmine taimekaitsevahendi teadus- või arendustöö eesmärgil katse läbi viimiseks“ asendades tekstiosa „Põllumajandusameti peadirektori 31.01.2020. a käskkirjaga nr 7-1/9“ tekstiosaga „Põllumajandusameti peadirektori 03.04.2020. a käskkirjaga nr 7-5/6“.

Käesolevat otsust on võimalik vaidlustada esitades vaide Põllumajandusameti peadirektorile haldusmenetluse seaduses paragrahvides 75 ja 76 sätestatud korras ning tähtajal või esitades kaebuse Halduskohtusse halduskohtumenetluse seadustikus paragrahvides 7, 38 ja 46 sätestatud korras ja tähtajal.

Saata: Eesti Maaülikooli põllumajandus- ja keskkonnainstituut

Eliise Mesi
taimekaitse ja väetise osakonna nõunik

Lisa 3. Uurimistöös katsetatud liigispetsiifilised praimerid

Liik	Praimerid	Järjestus	Viide	Gradient PCR	Rohuproovidega PCR
<i>Fusarium graminearum</i>	Fg16NF	5'-ACAGATGACAAGATTTCAGGCACA-3'	Nicholson <i>et al.</i> 1998	+	+
	Fg16NR	5'-TTCTTTGACATCTGTTCAACCCA-3'			
	Tri6_1F	5'-TCACTACGAATCTTGGAGCGCCTT-3'	Horevaj <i>et al.</i> 2011	-	-
	Tri6_1R	5'-AGATCTGGGACAAAGTCCTTGGCA-3'			
<i>Fusarium poae</i>	FpoaeA51	5'-ACCGAATCTCAACTCCGCTTT-3'	Nicolaisen <i>et al.</i> 2009	-	-
	FpoaeA98	5'-GTCTGTCAAGCATGTTAGCACAAGT-3'			
	TMpoaef	5'-GCTGAGGGTAAGCCGTCCTT-3'	Yli-Mattila <i>et al.</i> 2008	+	-
	TMpoaer	5'-TCTGTCCCCCTACCAAGCT-3'			
	Fp8F	5'-ACGACGAAGGTGGTTATG-3'	Waalwijk <i>et al.</i> 2003	-	-
	Fp8R	5'-GGTGAAGAGCCTGTTTGCTTG-3'			
	Fps-F	5'-CGCACGTATAGATGGACAAG-3'	Jurado <i>et al.</i> 2005	+	-
	Fpo-R	5'-CAGCGCACCCCTCAGAGC-3'			
	Fp82f	5'-CAAGCAAACAGGCTCTTACC-3'	Parry, Nicholson 1996	-	-
	Fp82r	5'-TGTTCCACCTCAGTGACAGGTT-3'			
	PoaelGS	5'-CAAGCTCTCCTCGGAGAGTCGAA-3'	Yli-Mattila <i>et al.</i> 2004	+	+
	CNL12	5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAG-3'			
	Fp60F	5'-AACCGAATCTCAACTCCGCTTT-3'	Stakheev <i>et al.</i> 2011	-	-
	Fp220R	5'-ACTCGAGCGGGGTAACAGGTGT-3'			
	FculC561	5'-CACCGTCATTGGTATGTTGTCACT-3'	Nicolaisen <i>et al.</i> 2009	-	-
	FculC614	5'-CGGGAGCGTCTGATAGTCG-3'			
	OPT18F	5'-GATGCCAGACCAAGACGAAG-3'	Schilling <i>et al.</i> 1996	+	+
	OPT18R	5'-GATGCCAGACGCACTAAGAT-3'			

<i>Fusarium culmorum</i>	Fcu-F	5'-GACTATCATTATGCTTGCGAGAG-3'	Jurado <i>et al.</i> 2005	-	-
	Fcu-R	5'-CTCTCATATACCCTCCG-3'			
	Fc01F	5'-ATGGTGAACCTCGTCGTGGC-3'	Waalwijk <i>et al.</i> 2003	+	-
	Fc01R	5'-CCCTTCTTACGCCAATCTCG-3'			
	175f	5'-TTTTAGTGGAACCTTCTGAGTAT-3'	Mishra <i>et al.</i> 2003	+	-
	430r	5'-AGTGCAGCAGGACTGCAGC-3'			
<i>Fusarium cerealis</i>	Fgc210F	5'-CGCCCTTTTCCCTTTTCGAAA-3'	Stakheev <i>et al.</i> 2011	+	-
	Fgc605R	5'-CATGTTAGTATGAGAATGTGATGACA-3'			
	FcerPHOF	5'-CAAGTCGGTCGCT CATTGTTC-3'	Stakheev <i>et al.</i> 2013	-	-
	FcerPHOR	5'-AGATAGATTACATGCCAAGAATATG-3'			
<i>Fusarium avenaceum</i>	CRO-AF	5'-CTCAGTGTCCACCGCGTTGCGTAG-3'	Yoder, Christianson 1998	+	+
	CRO-AR	5'-CTCAGTGTCCCATCAAATAGTCC-3'			
	Fave574	5'-TATGTTGTCACTGTCTCACACCACC-3'	Nicolaisen <i>et al.</i> 2009	+	-
	Fave627	5'-AGAGGGATGTTAGCATGATGAAG-3'			
	TMAVf	5'-AGATCGGACAATGGTGCATTATAA-3'	Halstensen <i>et al.</i> 2006	-	-
	TMAVr	5'-GGCCCTACTATTTACTCTTGCTTTTG-3'			
	FaF	5'-CAAGCATTGTCGCCACTCTC-3'	Waalwijk <i>et al.</i> 2003	-	-
	FaR	5'-GTTTGGCTCTACCGGGACTG-3'			
	JIAf	5'-GCTAATTCTTAACCTTACTAGGGGCC-3'	Turner <i>et al.</i> 1998	+	-
	JIAr	5'-CTGTAATAGGTTATTTACATGGGCG-3'			
<i>Fusarium tricinctum</i>	Fat60F	5'-AGTCGCTTATCTGCACTCGGA-3'	Stakheev <i>et al.</i> 2011	-	-
	Fat330R	5'-GTCAGAGTGGCGGGGTAAGATA-3'			
<i>Fusarium tricinctum</i>	TRI1	5'-CGTGTCCCTCTGTACAGCTTTGA-3'	Kulik 2008	+	-
	TRI2	5'-GTGGTTACCTCCCGATACTCTA-3'			

Märkused:

1. „+“ tähistab antud reaktsioonis töötavat praimeripaari ja „-“ tähistab mittetöötavat praimeripaari.

Lisa 4. Rohuproovide PCR analüüside positiivsed ja negatiivsed tulemused

Proovi nr.	Proovi tähis	Perekonnaspets. PCR	Liigispets. PCR <i>F. graminearum</i>	Liigispets. PCR <i>F. culmorum</i>	Liigispets. PCR <i>F. cerealis</i>	Liigispets. PCR <i>F. poae</i>
1	R1 K(1)	-	-	-	+	-
2	R1 K(2)	-	-	-	+	+
3	R1 K(3)	+	-	-	+	-
4	R1 F1(1)	+	-	-	+	-
5	R1 F1(2)	+	-	-	+	-
6	R1 F1(3)	+	-	-	+	-
7	R1 F2(1)	+	-	-	+	-
8	R1 F2(2)	-	-	-	-	-
9	R1 F2(3)	+	-	-	+	-
10	R1 F3(1)	-	-	-	+	-
11	R1 F3(2)	+	-	-	+	-
12	R1 F3(3)	+	-	-	+	-
13	R2 K(1)	-	-	-	-	-
14	R2 K(2)	+	-	-	-	-
15	R2 K(3)	-	-	-	-	-
16	R2 F1(1)	+	-	-	-	+
17	R2 F1(2)	-	-	-	-	-
18	R2 F1(3)	-	-	-	-	-
19	R2 F2(1)	+	-	-	-	-
20	R2 F2(2)	-	-	-	-	-
21	R2 F2(3)	-	-	-	-	-
22	R2 F3(1)	-	-	-	-	+
23	R2 F3(2)	-	-	-	-	+
24	R2 F3(3)	+	-	-	+	+
25	KN(1)	+	-	-	-	+
26	KN(2)	+	-	-	-	+
27	KN(3)	+	-	-	-	+
28	F1N(1)	-	-	-	-	-
29	F1N(2)	+	-	-	-	-
30	F1N(3)	+	-	-	-	-
31	F2N(1)	-	-	-	-	+
32	F2N(2)	-	-	-	-	-
33	F2N(3)	+	-	+	-	-
34	F3N(1)	+	-	-	-	+
35	F3N(2)	+	-	-	-	+
36	F3N(3)	+	-	-	-	+

Märkused:

1. „+“ tähistab positiivset tulemust ehk proovis tuvastati antud liigi DNA.
2. „-“ tähistab negatiivset tulemust ehk proovis ei tuvastatud antud liigi DNA-d.
3. „R1“ tähistab enne ja „R2“ tähistab pärast fungitsiididega töötlemist kogutud proove.
4. „N“ tähistab närvutatud proove.

Lisa 5. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ning juhendajate kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Meelis Kõiv,
(sünniaeg 05/02/1991, 39102056520)

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö „Fungitsiididega töötlemise mõju mükotoksiine tootvate *Fusarium* perekonna seeneliikide esinemisele rohusilo tootmiseks kasvatatavas heintaimikus“, mille juhendajad on Britt Puidet ja Kaire Loit,

- 1.1. salvestamiseks säilitamise eesmärgil,
- 1.2. digiarhiivi DSpace lisamiseks ja
- 1.3. veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor

allkiri

Tartu, 21.05.2021

Juhendajate kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)